



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.

A61K 36/484 (2006.01) A61K 31/352 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0043080

(22) 출원일자 2010년05월07일

심사청구일자 2010년05월07일

(30) 우선권주장

1020090107153 2009년11월06일 대한민국(KR)

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원 춘천시 한림대학길 39 한림대학교

(72) 발명자

박정한윤

강원도 춘천시 후평1동 846-1 현대맨션 101동 101호

박소영

서울 노원구 중계1동 청구3차아파트 105동 503호

(74) 대리인

유미특허법인

(뒷면에 계속)

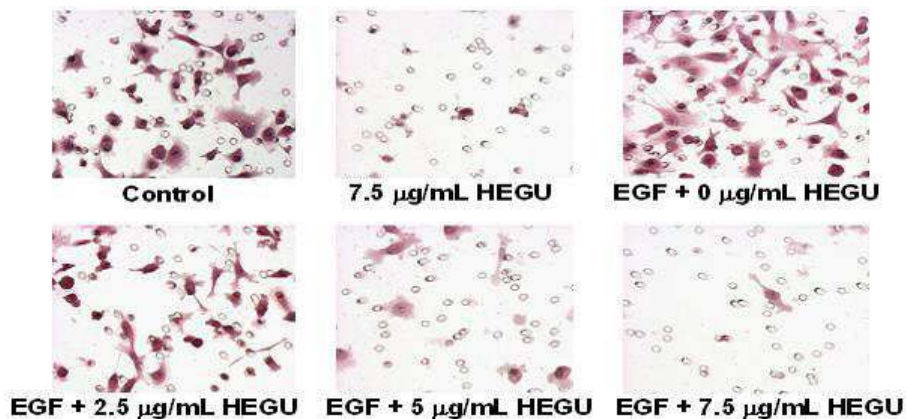
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 감초 추출물을 포함하는 항암 또는 암전이 억제용 조성물

(57) 요약

감초의 유기 용매 추출물, 이의 분획물 및 이로부터 분리된 화합물의 항암 및/또는 암전이 억제에 있어서의 신규한 용도가 제공된다. 즉, 감초의 유기 용매 추출물, 이의 분획물 및 이로부터 분리된 화합물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 항암 및/또는 암전이 억제용 조성물이 제공된다.

대표도 - 도1a



(72) 발명자

임순성

강원도 춘천시 퇴계동 916-3 그린타운아파트 102동
401호

김진규

강원도 춘천시 퇴계동 프란체아파트 1005동 1103호

이연실

강원도 춘천시 교동 135-2 302호

특허청구의 범위

청구항 1

감초의 유기 용매 추출물을 유효성분으로 함유하고,

상기 유기 용매 추출물은 C₅ 내지 C₇의 알칸과 C₁ 내지 C₄의 알코올의 혼합 용매로 추출하여 얻어진 것인,

항암 또는 암전이 억제용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 유기 용매 추출물은 C₅ 내지 C₇의 알칸과 C₁ 내지 C₄의 알코올이 부피 기준으로 7:1 내지 12:1 (알칸 부피:알코올 부피)의 혼합비로 혼합된 혼합 용매로 추출하여 얻어진 것인, 항암 또는 암전이 억제용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 유기 용매 추출물은 감초를 노르말 헥산과 에탄올의 혼합 용매로 추출하여 얻어진 것인, 항암 또는 암전이 억제용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 유기 용매 추출물은 노르말 헥산과 에탄올이 부피 기준으로 7:1 내지 12:1 (노르말 헥산 부피:에탄올 부피)의 혼합비로 혼합된 혼합 용매로 추출하여 얻어진 것인, 항암 또는 암전이 억제용 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유기 용매 추출물은 상기 얻어진 추출물을 헥산, 에틸아세테이트, 메틸렌클로라이드, C₁ 내지 C₄의 알코올, 아세톤 및 아세토니트릴로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상으로 추가로 분획하여 얻어진 것인, 항암 또는 암전이 억제용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 유기 용매 추출물은 상기 얻어진 분획물을 물, C₁ 내지 C₄의 알코올, 아세톤 및 아세토니트릴로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상으로 추가로 분획하여 얻어진 것인, 항암 또는 암전이 억제용 조성물.

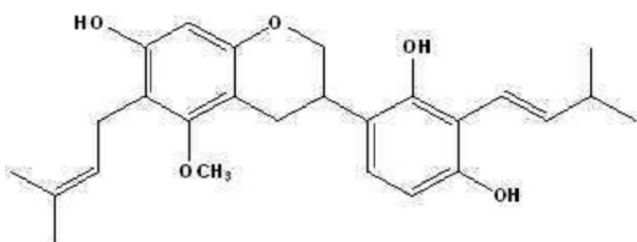
청구항 7

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 감초는 *Glycyrrhiza uralensis*, *Glycyrrhiza glabra*, *Glycyrrhiza inflata*, *Glycyrrhiza ergcarpa*, *Glycyrrhiza yunnanensis*, *Glycyrrhiza pallidiflora*, 및 *Glycyrrhiza squamulosa* 로 이루어진 군에서 선택된 것인, 항암 또는 암전이 억제용 조성물.

청구항 8

화학식 1의 리코리시딘(licoricidin), 및 이들의 약학적으로 허용 가능한 염으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 항암 또는 암전이 억제용 조성물:

<화학식 1>



청구항 9

제1항 내지 제4항 및 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 전립선암, 유방암, 대장암, 및 폐암으로 이루어진 군에서 선택된 암의 전이 억제 효과를 갖는 것인, 항암 또는 암전이 억제용 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제4항 및 제8항 중 어느 한 항에 따른 암전이 억제용 조성물을 포함하는 암 또는 암전이의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 11

제5항에 따른 암전이 억제용 조성물을 포함하는 암 또는 암전이의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 12

제6항에 따른 항암 또는 암전이 억제용 조성물을 포함하는 암 또는 암전이의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 13

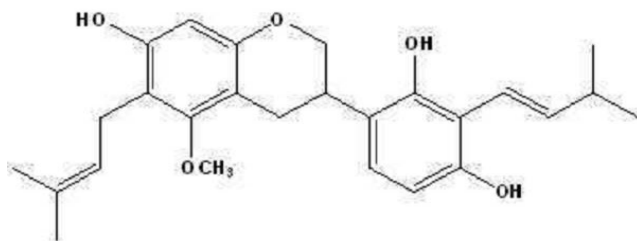
1) 감초를 C₅ 내지 C₇의 알칸과 C₁ 내지 C₄의 알코올이 부피 기준으로 7:1 내지 12:1 (알칸 부피:알코올 부피)의 혼합비로 혼합된 혼합 용매로 추출하는 단계;

2) 상기 얻어진 추출물을 헥산, 에틸아세테이트, 메틸렌클로라이드, C₁ 내지 C₄의 알코올, 아세톤 및 아세토니트릴로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상으로 분획하여 분획물을 얻는 단계;

3) 상기 얻어진 분획물을 물, C₁ 내지 C₄의 알코올, 아세톤 및 아세토니트릴로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상으로 분획하여 소분획물을 얻는 단계

를 포함하는, 화학식 1의 리코리시딘(licoricidin)의 제조 방법:

<화학식 1>



명세서

기술 분야

[0001]

감초의 유기 용매 추출물, 이의 분획물 및 이로부터 분리된 화합물의 항암 및/또는 암전이 억제에 있어서의 신규한 용도가 제공된다. 즉, 감초의 유기 용매 추출물, 이의 분획물 및 이로부터 분리된 화합물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 항암 및/또는 암전이 억제용 조성물이 제공된다

배경 기술

[0002]

암환자의 주된 사망요인은 초기 종양에 의한 것이 아니고 암세포의 다른 조직으로의 전이에 의한 것이다. 이에 따라, 현재 암세포의 침윤과 전이의 기작과 이를 억제하는 방법에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 암세포의 전이과정을 살펴보면, 먼저 원발종양으로부터 전이성 암세포가 떨어져 나와 정상조직의 간질과 기저막과 같은 지지구조체로 침윤해 들어가서 다른 목표 조직의 모세혈관 벽에 부착하고 세포외기질과 기저막을 분해한 후 모세혈관으로 유출, 새로운 조직에서 혈관 신생이 동반되어 이차종양이 형성되는 것이다. 따라서, 전이과정은 이동(migration), 부착(adhesion), 침윤(invasion) 등의 주요 단계로 구성되어 있으며, 이 중에서 어느 하나를

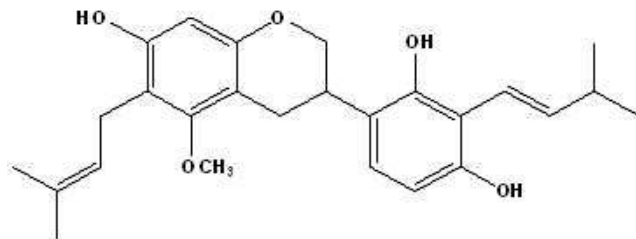
막을 수 있다면 암전이를 억제할 수 있다.

- [0003] 암세포의 침윤은 부착된 세포가 분비하는 매트릭스 분해 메탈로프로테인효소(MMPs)가 중요한 역할을 한다. MMPs (matrix metalloproteinases)는 콜라겐, 프로테오글리칸 등을 분해하는 효소로 간질 콜라겐효소, MMP2, 스트로머라이신(stromelysin) 등이 있는데 이들 모두 활성중심부에 Zn을 가지는 금속효소이고 자이모겐(zymogen) 형태로 분비되어 다른 단백질 분해효소나 유기인 화합물에 의하여 활성화되고 MMP와 함께 분비되는 TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinase)에 의해 활성이 저해되며 cDNA 배열에 있어서 상동성을 지니고 있어 MMPs로 분류된다. 실제 전이가 활발한 암세포에서는 정상적인 세포나 비전이성 암세포에 비해 MMP2나 MMP9의 활성이 높으며 이를 저해하는 물질들이 암전이를 억제하는 것으로 나타났다.
- [0004] 이러한 암 전이 억제 효능을 갖는 천연 생약재로는 감귤에서 분리한 다당류, 인삼의 사포닌화합물, 당귀의 다당류 등이 알려져 있으나, 아직 연구가 미진한 상황이며, 부작용 우려가 없는 천연성분의 암전이 억제제의 개발이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 본 발명자들은 감초의 유기 용매 추출물이 항암 및/또는 암 전이 억제에 우수한 효과를 가짐을 확인하고, 유효 분획을 제조하여, 이로부터 유효 화합물을 분리 정제하여, 본 발명을 완성하였다.
- [0006] 이에, 본 발명의 일례는 감초의 유기 용매 추출물을 유효성분으로 함유하는 항암 및/또는 암전이 억제용 조성물을 제공한다.
- [0007] 또 다른 예는 화학식 1의 리코리시딘(licoricidin), 및/또는 이들의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 항암 및/또는 암전이 억제용 조성물을 제공한다.
- [0008] <화학식 1>



- [0009]
- [0010] 또 다른 예는 상기 암전이 억제용 조성물을 포함하는 항암 및/또는 암전이 예방 및/또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0011] 또 다른 예는 감초로부터 상기 화학식 1의 리코리시딘을 분리 정제하여 제조하는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

- [0012] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.
- [0013] 우선, 암전이 억제 활성이 우수한 감초 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암 및/또는 암전이 억제용 조성물이 제공된다.
- [0014] 감초는 장미목 콩과에 속하는 여러해살이풀이고, 천연 생약으로 이용되는 식물 중에서 그 생산지가 상이한 종류를 혼용하고 있는 대표적 식물이다. 상기 감초는 예컨대, *Glycyrrhiza uralensis*, *Glycyrrhiza glabra*, *Glycyrrhiza inflata*, *Glycyrrhiza ergcarpa*, *Glycyrrhiza yunnanensis*, *Glycyrrhiza pallidiflora*, *Glycyrrhiza squamulosa* 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 것일 수 있고, 바람직하게는 *Glycyrrhiza uralensis*, *Glycyrrhiza inflata*, 및/또는 *Glycyrrhiza glabra*일 수 있다. 또한, 상기 감초는 잎, 줄기 및 뿌리로 이루어진 군에서 선택된 어느 1종 이상일 수 있으며, 바람직하게는 뿌리 및 줄기로 이루어진 군에서 선택

된 1종 이상일 수 있다.

- [0015] 상기 감초 추출물은 유기용매를 이용하여 통상의 식물 추출방법으로 제조할 수 있다. 상기 유기 용매는 C₅ 내지 C₇의 직쇄 또는 분쇄 알칸과 C₁ 내지 C₄의 알코올의 혼합 용매일 수 있으며, 보다 바람직하게는 노르말 헥산과 에탄올의 혼합 용매인 것이 좋다. 또한, C₅ 내지 C₇의 알칸과 C₁ 내지 C₄의 알코올의 혼합 용매는 C₅ 내지 C₇의 알칸과 C₁ 내지 C₄의 알코올이 부피비 기준으로 7:1 내지 12:1(알칸 부피:에탄올 부피), 바람직하게는 8:1 내지 10:1으로 혼합된 것일 수 있다. 암전이 억제 활성을 나타내는 활성성분을 고수율로 수득하기 위하여, 암전이 억제 활성을 나타내는 물질의 성질과 추출물의 추출 수율을 고려하여, 상기 혼합 용매는 노르말헥산과 에탄올이 부피비 기준으로 7:1 내지 12:1(노르말 헥산 부피:에탄올 부피), 바람직하게는 8:1 내지 10:1로 혼합된 혼합 용매인 것이 가장 바람직하다.
- [0016] 본 발명의 감초 추출물은 통상의 식물 추출물의 제조방법에 따라 제조된 것일 수 있으며, 바람직하게는 가압추출법, 환류추출법, 초음파 분쇄 추출법 등에 의할 수 있고, 바람직하게는 가압추출법에 의할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0017] 상기 가압추출법은 기기를 이용한 기기추출법일 수 있다. 상기 가압추출법은 40 내지 60℃ 및 1400 psi 내지 1600 psi 조건에서 수행할 수 있고, 바람직하게는 45 내지 55℃ 및 1450 psi 내지 1550 psi 조건에서 수행할 수 있다. 또한, 상기 가압추출법은 5분 내지 10시간, 바람직하게는 10분 내지 1시간동안 수행할 수 있다.
- [0018] 상기 초음파 분쇄 추출법은 40 내지 60℃, 바람직하게는 45 내지 55℃ 및 5 내지 100 kHz, 바람직하게는 10 내지 75 kHz, 더욱 바람직하게는 20 내지 40 kHz의 조건에서 수행할 수 있다. 또한, 상기 초음파 분쇄 추출법은 1일 내지 48일, 바람직하게는 10일 내지 30일, 더욱 바람직하게는 14일 내지 21일 동안 수행할 수 있다.
- [0019] 상기 추출법의 추출조건 및 추출시간은 추출물을 고수율로 수득하고, 추출물 내에 항산화활성을 가진 유효성분의 함량을 높이기 위하여 결정된 범위이다.
- [0020] 또한, 상기한 바와 같이 제조된 추출물, 구체적으로 추출액은 이후 감압 여과과정을 수행하거나 추가로 농축 및/또는 동결건조를 수행하여 농축하거나 용매를 제거할 수 있다. 따라서, 본 발명에서의 감초 추출물은 통상적 방법으로 건조된 건조물과 통상적 방법으로 농축된 농축물을 포함하는 의미로 사용된다.
- [0021] 한 구체예에서, 상기 감초 추출물은 유수로 세척한 감초를 마쇄기로 분쇄하고, 추출용매, 노르말헥산과 에탄올의 혼합용매, 바람직하게는 노르말헥산과 에탄올이 부피비 기준으로 7:1 내지 12:1, 바람직하게는 8:1 내지 10:1(노르말 헥산 부피:에탄올 부피)의 혼합비로 혼합된 혼합 용매를 가한 후에, 추출기기를 이용하여 가압추출을 수행하거나 초음파 분쇄 추출기를 이용하여 초음파 분쇄 추출을 수행하여 얻어진 것일 수 있다. 상기 추출물은 수득된 추출액에 대해 여과과정을 수행하거나 농축 및/또는 동결건조를 수행하여 제조할 수 있다. 상기 여과과정을 수행하여 에탄올 추출액에 남아 있는 잔사 등을 제거할 수 있으며, 상기 농축 및/또는 동결건조를 수행하여 수분을 제거할 수 있다.
- [0022] 일례로, 상기 가압추출은 감초 즉, 분쇄시료 30 g당 상기 노르말 헥산과 에탄올의 혼합용매 50 mL 내지 500 mL, 바람직하게는 100 mL 내지 300 mL를 가한 후, 40 내지 60℃ 및 1400 psi 내지 1600 psi의 조건, 바람직하게는 45 내지 55℃ 및 1450 psi 내지 1550 psi 조건에서 5분 내지 1시간, 바람직하게는 10분 내지 30분 동안 수행할 수 있다. 가압추출하는 방법으로 수행할 수 있다. 상기 추출은, 특별한 제한은 없지만, 3회 반복하여 수행할 수 있으며, 상기 3회 반복하여 추출된 추출액을 함께 감압조건에서 농축하여 감초 추출물을 수득할 수 있다.
- [0023] 다른 일 예로, 상기 초음파 분쇄 추출은 감초 즉, 분쇄시료 100 g당 상기 노르말 헥산과 에탄올의 혼합용매 100 mL 내지 2 L, 바람직하게는 500 mL 내지 1500 mL를 가한 후, 40 내지 60℃, 바람직하게는 45 내지 55℃ 및 5 내지 100 kHz, 바람직하게는 10 내지 75 kHz, 더욱 바람직하게는 20 내지 40 kHz의 조건에서 10일 내지 30일, 바람직하게는 14일 내지 21일동안 초음파 분쇄 추출법으로 수행할 수 있다. 상기 추출은, 특별한 제한은 없지만, 3회 반복하여 수행할 수 있으며, 상기 3회 반복하여 추출된 추출액을 함께 감압조건에서 농축하여 감초 추출물을 수득할 수 있다.
- [0024] 본 발명에 따른 상기 감초 추출물은 암세포 이동(migration) 및 침윤(invasion)에 대하여 억제 활성이 우수하며(실험예 1 및 2 참조), 암 전이와 관련된 MMPs (matrix metalloproteinases), TIMPs (tissue inhibitor of metalloprotenases), uPA (urokinase-type plasminogen activator), VEGF (Vascular endothelial growth factor), integrin- α 2, ICAM (Intercellular adhesion molecule), 및 VCAM (vascular cell adhesion molecule)의 수준을 농도 의존적으로 억제하는 반면, TIMP-2의 수준은 증가시키는 것으로 나타났으며, EGF 처리

에 의하여 MMPs, TIMPs, uPA, VEGF, integrin- α 2, ICAM, 및 VCAM의 수준이 증가된 경우에도 우수한 감소 효과를 보이며, 반대로 EGF 처리에 TIMP-2의 수준이 감소한 경우에도 우수한 증가 효과를 보이는 것으로 나타났다 (실험예 3 및 4 참조). 이러한 활성에 의하여, 감초 추출물은 우수한 암전이 억제 활성, 및 이러한 암전이 억제 활성으로 인한 항암 활성을 나타낸다. 따라서, 본 발명의 감초 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 암 전이 효과와 함께 이로 인한 항암 효과도 가질 수 있다.

[0025] 상기 감초 추출물은

[0026] 감초를 C₆ 내지 C₇의 직쇄 또는 분지쇄 알칸과 C₁ 내지 C₄의 알코올의 혼합 용매, C₆ 내지 C₇의 직쇄 또는 분지쇄 알칸과 C₁ 내지 C₄의 알코올이 부피비 기준으로 7:1 내지 12:1(알칸 부피:알코올 부피), 바람직하게는 8:1 내지 10:1으로 혼합된 혼합 용매, 더욱 바람직하게는 노르말 헥산과 에탄올의 혼합 용매, 가장 바람직하게는 노르말 헥산과 에탄올이 부피비 기준으로 7:1 내지 12:1(노르말 헥산 부피:에탄올 부피), 바람직하게는 8:1 내지 10:1로 혼합된 혼합 용매를 사용하여 추출한 추출물;

[0027] 상기 추출물에 대하여, 헥산, 에틸아세테이트, 메틸렌클로라이드, C₁ 내지 C₄의 알코올, 클로로포름, 아세톤 및 아세토니트릴로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상, 바람직하게는 노르말헥산과 에틸아세테이트 혼합 용액, 더욱 바람직하게는 노르말헥산과 에틸아세테이트가 부피비 기준으로 14:1 내지 3:1(노르말 헥산 부피:에틸아세테이트 부피), 보다 바람직하게는 12:1 내지 4:1로 혼합된 혼합용액을 사용하여 크로마토그래피하여 얻어진 분획물; 및 /또는

[0028] 상기 분획물에 대하여, 물, C₁ 내지 C₄의 알코올, 아세톤 및 아세토니트릴로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상, 바람직하게는 물과 C₁ 내지 C₄의 알코올 혼합 용액, 더욱 바람직하게는 10 내지 100 %(v/v)의 메탄올 또는 에탄올, 보다 바람직하게는 25 내지 55%(v/v) 또는 75 내지 85 %(v/v)의 메탄올 또는 에탄올을 사용하여 추가로 크로마토그래피하여 얻어진 소분획물

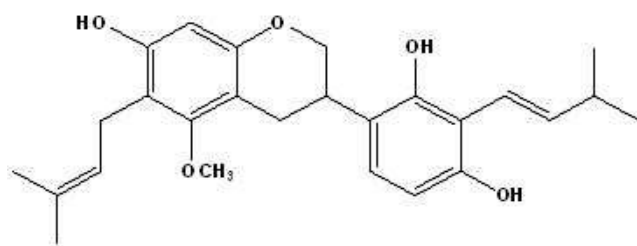
[0029] 일 수 있다.

[0030] 상기 분획물 및/또는 소분획물은 암세포 이동(migration) 억제 활성이 우수한 것으로 나타나서 (실험예 5 참조), 항암 및/또는 암전이 억제용 조성물의 활성 성분으로 사용될 수 있다.

[0031] 따라서, 본 발명에서 감초 추출물은 상기한 바와 같은 분획물 및 소분획물도 포함하는 의미로 사용된다.

[0032] 또 다른 예에서, 화학식 1의 리코리시딘(licoricidin), 및 이들의 약학적으로 허용 가능한 염으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 항암 및/또는 암전이 억제용 조성물이 제공된다.

[0033] <화학식 1>



[0034]

[0035] 상기 리코리시딘은 암세포 이동(migration)에 대하여 억제 활성이 우수하며 (실험예 6 참조), 암 전이와 관련된 MMPs, TIMPs, uPA, VEGF, integrin- α 2, ICAM, 및 VCAM의 수준을 농도 의존적으로 억제하는 반면, TIMP-2의 수준은 증가시키는 것으로 나타났으며, EGF 처리에 의하여 MMPs, TIMPs, uPA, VEGF, integrin- α 2, ICAM, 및 VCAM의 수준이 증가된 경우에도 우수한 감소 효과를 보이며, 반대로 EGF 처리에 TIMP-2의 수준이 감소한 경우에도 우수한 증가 효과를 보이는 것으로 나타났다 (실험예 7 참조). 이러한 활성에 의하여, 리코리시딘은 우수한 암전이 억제 활성, 및 이러한 암 전이 억제 활성으로 인한 항암 활성을 나타낸다. 따라서, 본 발명의 리코리시딘을 유효성분으로 포함하는 조성물은 암 전이 억제 효과와, 이로 인한 항암 효과를 가질 수 있다.

[0036] 상기 유효성분으로 사용되는 화학식 1의 리코리시딘은 그 자체, 또는 염의 형태로 사용될 수 있다. 상기 염으로는 약학적으로 허용 가능한 염인 유리산(free acid)에 의하여 형성된 산 부가염이 바람직하다. 상기 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있다. 상기 유기산은 약학적으로 허용 가능한 모든 유기산일 수 있으며, 예컨대, 구연산, 초산, 젖산, 주석산, 말레인산, 푸마르산, 포름산, 프로피온산, 옥살산,

트리플로오로아세트산, 벤조산, 글루콘산, 메타술폰산, 글리콜산, 숙신산, 4-톨루엔술폰산, 글루탄산, 아스파르트산 등일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 무기산은 약학적으로 허용 가능한 모든 무기산일 수 있으며, 예컨대, 염산, 브롬산, 황산, 인산 등일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0037] 본 발명의 암전이 억제용 조성물이 항암 및/또는 전이 억제 활성을 갖는 암은 전립선암, 유방암, 대장암, 폐암 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

[0038] 본 발명의 항암 및/또는 암전이 억제용 조성물은 유효성분인 감초 추출물 및/또는 리코리시딘 외에 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 증진제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 추가로 함유할 수 있다. 상기 항산화 조성물에는 상기 성분들이 독립적으로 또는 조합하여 추가될 수 있다. 상기 추가성분의 함량은 바람직하게는 상기 감초 추출물 100 중량부 당 0.1 내지 20 중량부 범위 또는 리코리시딘 100 중량부 당 100 내지 10,000,000 중량부 범위에서 추가할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0039] 상기 조성물 내의 상기 감초 추출물 및/또는 리코리시딘의 함량은 질환의 증상, 증상의 진행 정도, 환자의 상태 등에 따라서 적절히 조절 가능하며, 예컨대, 전체 조성물 중량을 기준으로 0.0001 내지 99.9중량%, 바람직하게는 0.001 내지 50중량%인 것이 좋으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 함량비는 추출물의 경우 용매를 제거한 건조량을 기준으로 한 값이다.

[0040] 상기 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있으며, 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0041] 상기 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 증진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 적어도 한 가지 이상의 부형제 및/또는 윤활제 등을 포함할 수 있다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다.

[0042] 상기 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 보다 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 조성물의 투여량은 유효성분을 기준으로 1일 0.1 mg/kg 내지 20 mg/kg으로 하는 것이 좋으나 이에 제한되는 것은 아니다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수 있다. 본 발명의 조성물은 동물, 바람직하게는 인간을 포함하는 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 정맥, 근육, 피하주사 등에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물의 약학적 투여 형태는 유효성분의 약학적 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.

[0043] 또 다른 예에서, 감초 추출물 및/또는 리코리시딘을 포함하는 암 및/또는 암전이의 예방 및/또는 개선용 식품 조성물이 제공된다. 본 발명에서 식품은 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 각종 식품, 건강기능 식품, 음료, 식품 첨가제 및 음료 첨가제를 모두 포함하는 의미로 사용되며, 식품 조성물은 상기 식품에 사용된다. 상기 식품의 예로서 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 기능성 식품 등이 있다. 추가로, 본 발명에서 식품에는 특수영양식품(예, 조제유류, 영, 유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 묵류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 건강보조식품, 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예, 스낵류), 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예, 과일, 채소류 음료, 두유류, 발효음료류, 아이스크림류 등), 천연조미료(예, 라면 스프 등), 비타민 복합제, 알코올 음료, 주류 및 그 밖의 건강보조식품류를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 건강기능식품, 음료, 식품첨가제 또는 음료첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.

[0044] 상기 식품 조성물은 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 기능성 식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.

[0045] 또한, 상기 식품 조성물에 있어서, 상기 감초 추출물의 양은 전체 식품 중량의 0.00001 중량% 내지 50 중량%로 포함될 수 있으며, 상기 리코리시딘의 양은 전체 식품 중량의 0.00001 중량% 내지 5 중량%로 포함될 수 있고,

상기 식품 조성물이 음료인 경우에는 감초 추출물의 양은 식품 전체의 부피 100 ml 를 기준으로 0.001 g 내지 50 g, 바람직하게는 0.01 g 내지 10 g의 비율로 포함되거나 상기 리코리시딘의 양은 식품 전체의 부피 100 ml 를 기준으로 0.000001 g 내지 0.5 g, 바람직하게는 0.0001 g 내지 0.1 g의 비율로 포함될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0046] 또 다른 예에서, 감초로부터 상기 화학식 1의 리코리시딘을 제조하는 방법이 제공된다. 상기 제조 방법은

[0047] 1) 감초를 C₅ 내지 C₇의 직쇄 또는 분지쇄 알칸과 C₁ 내지 C₄의 알코올의 혼합 용매일 수 있으며, 보다 바람직하게는 노르말 헥산과 에탄올의 혼합 용매인 것이 좋다. 또한, C₅ 내지 C₇의 알칸과 C₁ 내지 C₄의 알코올의 혼합 용매는 C₅ 내지 C₇의 알칸과 C₁ 내지 C₄의 알코올이 부피비 기준으로 7:1 내지 12:1(노르말 헥산 부피:에탄올 부피), 바람직하게는 8:1 내지 10:1으로 혼합된 유기 용매로 추출하는 단계;

[0048] 2) 상기 얻어진 추출물을 헥산, 에틸아세테이트, 메틸렌클로라이드, C₁ 내지 C₄의 알코올, 클로로포름, 아세톤 및 아세토니트릴로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상, 바람직하게는 노르말헥산과 에틸아세테이트 혼합 용액, 더욱 바람직하게는 노르말헥산과 에틸아세테이트가 부피비 기준으로 14:1 내지 3:1(노르말 헥산 부피:에틸아세테이트 부피), 보다 바람직하게는 12:1 내지 4:1로 혼합된 혼합용액으로 분획하여 분획물을 얻는 단계;

[0049] 3) 상기 얻어진 분획물을 물, C₁ 내지 C₄의 알코올, 아세톤 및 아세토니트릴로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상, 바람직하게는 물과 C₁ 내지 C₄의 알코올의 혼합 용액, 더욱 바람직하게는 10 내지 100%(v/v)의 메탄올 또는 에탄올, 보다 바람직하게는 25 내지 55%(v/v) 또는 75 내지 85 %(v/v)의 메탄올 또는 에탄올로 분획하여 소분획물을 얻는 단계를 포함할 수 있다.

[0050] 상기 유기용매를 이용하여 통상의 식물 추출방법으로 제조할 수 있다. 상기 유기 용매는 C₅ 내지 C₇의 직쇄 또는 분지쇄 알칸과 C₁ 내지 C₄의 알코올의 혼합 용매일 수 있으며, 보다 바람직하게는 노르말 헥산과 에탄올의 혼합 용매인 것이 좋다. 또한, C₅ 내지 C₇의 알칸과 C₁ 내지 C₄의 알코올의 혼합 용매는 C₅ 내지 C₇의 알칸과 C₁ 내지 C₄의 알코올이 부피비 기준으로 7:1 내지 12:1(노르말 헥산 부피:에탄올 부피), 바람직하게는 8:1 내지 10:1으로 혼합된 것일 수 있다. 암전이 억제 활성을 나타내는 활성성분을 고수율로 수득하기 위하여, 암전이 억제 활성을 나타내는 물질의 성질과 추출물의 추출 수율을 고려하여, 상기 혼합 용매는 노르말헥산과 에탄올이 부피비 기준으로 7:1 내지 12:1(노르말 헥산 부피:에탄올 부피), 바람직하게는 8:1 내지 10:1로 혼합된 혼합 용매인 것이 가장 바람직하다.

[0051] 상기 가압추출법은 40 내지 60℃ 및 1400 psi 내지 1600 psi 조건에서 수행할 수 있고, 바람직하게는 45 내지 55℃ 및 1450 psi 내지 1550 psi 조건에서 수행할 수 있다. 또한, 상기 가압추출법은 5분 내지 10시간, 바람직하게는 10분 내지 1시간동안 수행할 수 있다. 또한, 상기 초음파 분쇄 추출법은 40 내지 60℃, 바람직하게는 45 내지 55℃ 및 5 내지 100 kHz, 바람직하게는 10 내지 75 kHz, 더욱 바람직하게는 20 내지 40 kHz의 조건에서 수행할 수 있다. 또한, 상기 가압추출법은 1일 내지 48일, 바람직하게는 10일 내지 30일, 더욱 바람직하게는 14일 내지 21일동안 수행할 수 있다.

[0052] 상기 분획 과정은 물, 헥산, 에틸아세테이트, 메틸렌클로라이드, C₁ 내지 C₄의 알코올, 클로로포름, 아세톤 및 아세토니트릴로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 용매를 사용하여 수행되는 것일 수 있다.

[0053] 상기 분획 과정은 추출 후 추가로 크로마토그래피를 수행하는 것으로, 상기 크로마토그래피는 액체크로마토그래피법, 감압액체크로마토그래피법, 중압액체크로마토그래피법 및 고성능액체크로마토그래피법(high performance liquid chromatography, HPLC) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 감압액체크로마토그래피법 및 중압액체크로마토그래피법으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0054] 보다 구체적으로, 상기 분획물을 얻는 분획 과정은 헥산, 에틸아세테이트, 메틸렌클로라이드, C₁ 내지 C₄의 알코올, 클로로포름, 아세톤 및 아세토니트릴로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상, 바람직하게는 노르말헥산과 에틸아세테이트 혼합 용액, 더욱 바람직하게는 노르말헥산과 에틸아세테이트가 부피비 기준으로 14:1 내지 3:1(노르말 헥산 부피:에틸아세테이트 부피), 보다 바람직하게는 12:1 내지 4:1로 혼합된 혼합용액을 사용하여 크로마토그래피를 수행하여 이루어질 수 있다. 또한, 상기 소분획물을 얻는 분획 과정은 물, C₁ 내지 C₄의 알코올, 아세톤 및 아세토니트릴로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상, 바람직하게는 물과 C₁ 내지 C₄의 알코올 혼합 용액, 더욱 바람직하게는 10 내지 100 %(v/v)의 메탄올 또는 에탄올, 보다 바람직하게는 25 내지 55%(v/v) 또는

75 내지 85 %(v/v)의 메탄올 또는 에탄올을 사용하여 크로마토그래피를 수행하여 이루어질 수 있다.

발명의 효과

[0055]

본 발명의 감초 추출물, 분획물, 소분획물 및 이로부터 분리된 리코리시딘은 암세포 전이 억제 활성을 가짐으로써 항암 및/또는 암 전이의 예방 및/또는 치료용 조성물로서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0056]

도 1a 및 1b는 DU145 세포에서 EGF에 의해 유도된 세포이동(EGF-induced migration)에 대한 감초 추출물(HEGU)의 효과를 보여주는 것으로,

1a는 이동된 세포를 hematoxylin and eosin (H&E)로 염색하여 염색된 세포를 보여주는 사진이고,

1b는 상기 이동된 세포 수를 분석한 결과를 보여주는 그래프이다.

도 2a 및 2b는 DU145 세포에서 EGF에 의해 유도된 침윤 (EGF-induced invasion)에 대한 감초 추출물(HEGU)의 효과를 보여주는 것으로,

2a는 침윤된 세포를 hematoxylin and eosin (H&E)로 염색하여 염색된 세포를 보여주는 사진이고,

2b는 상기 침윤된 세포 수를 분석한 결과를 보여주는 그래프이다.

도 3a 및 3b는 DU145 세포에서 EGF에 의해 유도된 (EGF-induced) 기질 메탈로프로테네이즈 (matrix metalloproteinases, MMPs), 메탈로프로테네이즈 조직 억제제 (tissue inhibitor of metalloprotenases, TIMPs), 유로카이네이즈 유형 플라스미노겐 활성화제 (urokinase-type plasminogen activator, uPA) 및 혈관내 피세포 성장인자 (Vascular endothelial growth factor, VEGF)의 분비 (secretion)에 대한 감초 추출물(HEGU)의 효과를 보여주는 것으로,

3a는 젤라틴 자이모그래피(zymography)의 결과를 보여주는 쿠마시블루(Coomassieblue) 염색된 젤 사진이고,

3b는 웨스턴블라팅 결과를 보여주는 블랏의 화학발광반응 (chemiluminescent)을 보여주는 것이다.

도 4a 및 4b는 DU145 세포에서 EGF에 의해 유도된 세포 부착 (EGF-induced cell adhesion)에 대한 감초 추출물(HEGU)의 효과를 보여주는 것으로,

4a는 Human collagen type I 이 코팅된 플레이트에 부착된 DU145 세포의 수를 정량한 결과를 보여주는 그래프이고,

4b는 integrin- α 2, ICAM, 및 VCAM의 발현 정도를 보여주는 웨스턴블라팅 결과를 보여주는 것이다.

도 5는 DU145 세포에서 EGF에 의해 유도된 세포이동 (EGF-induced migration)에 대한 감초 추출물(HEGU) 분획의 효과를 보여주는 그래프로, A는 1차 분획물의 결과이고, B는 1차 분획물 중 결과가 가장 우수한 효과를 나타낸 분획물 89의 2차 분획물의 결과를 보여준다.

도 6a 및 6b는 DU145 세포에서 EGF에 의해 유도된 세포이동 (EGF-induced migration)에 대한 리코리시딘 (licoricidin)의 효과를 보여주는 것으로,

6a는 이동된 세포를 hematoxylin and eosin (H&E)로 염색하여 염색된 세포를 보여주는 사진이고,

6b는 상기 이동된 세포 수를 분석한 결과를 보여주는 그래프이다.

도 7a 및 7b는 DU145 세포에서 EGF에 의해 유도된 단백질 발현 (EGF-induced protein expression)에 대한 리코리시딘 (licoricidin)의 효과를 보여주는 것으로,

7a는 리코리시딘 처리에 따른 MMP-9, TIMP-1, uPA, 및 VEGF 발현 정도를 보여주는 웨스턴블라팅 결과이고,

7b는 리코리시딘 처리에 따른 integrin- α 2, ICAM, 및 VCAM 발현 정도를 보여주는 웨스턴블라팅 결과이다.

도 8은 소분획물 6 내지 9의 HPLC 스펙트럼 결과를 나타낸 것이다.

도 9a 및 9b는 PC3 세포에서 EGF에 의해 유도된 세포이동(EGF-induced migration)에 대한 감초 추출물(HEGU)의 효과를 보여주는 것으로,

9a는 이동된 세포를 hematoxylin and eosin (H&E)로 염색하여 염색된 세포를 보여주는 사진이고,

9b는 상기 이동된 세포 수를 분석한 결과를 보여주는 그래프이다.

도 10a 및 10b는 4T1 세포의 세포 이동(migration)에 대한 감초 추출물(HEGU)의 효과를 보여주는 것으로,

10a는 이동된 세포를 hematoxylin and eosin (H&E)로 염색하여 염색된 세포를 보여주는 사진이고,

10b는 상기 이동된 세포 수를 분석한 결과를 보여주는 그래프이다.

도 11a 및 11b는 CT26 세포의 세포 이동에 대한 감초 추출물(HEGU)의 효과를 보여주는 것으로,

11a는 이동된 세포를 hematoxylin and eosin (H&E)로 염색하여 염색된 세포를 보여주는 사진이고,

11b는 상기 이동된 세포 수를 분석한 결과를 보여주는 그래프이다.

도 12a 및 12b는 LLC 세포의 세포 이동에 대한 감초 추출물(HEGU)의 효과를 보여주는 것으로,

12a는 이동된 세포를 hematoxylin and eosin (H&E)로 염색하여 염색된 세포를 보여주는 사진이고,

12b는 상기 이동된 세포 수를 분석한 결과를 보여주는 그래프이다.

도 13a 및 13b는 CT26 세포에서 세포이동에 대한 리코리시딘 (licoricidin)의 효과를 보여주는 것으로,

13a는 이동된 세포를 hematoxylin and eosin (H&E)로 염색하여 염색된 세포를 보여주는 사진이고,

13b는 상기 이동된 세포 수를 분석한 결과를 보여주는 그래프이다.

도 14a 및 14b는 LLC 세포의 세포이동(migration)에 대한 리코리시딘 (licoricidin)의 효과를 보여주는 것으로,

14a는 이동된 세포를 hematoxylin and eosin (H&E)로 염색하여 염색된 세포를 보여주는 사진이고,

14b는 상기 이동된 세포 수를 분석한 결과를 보여주는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0057] 이하, 본 발명을 하기 실시 예에 의하여 상세히 설명한다.

[0058] 단, 하기 실시 예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 하기의 실시 예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0059] 실시 예 1: 감초 추출물의 제조

[0060] 약업사에서 입수한 감초 (*Glycyrrhiza uralensis*) 8 kg을 유수에 세척한 후, 실온에서 건조시키고 마쇄기를 이용하여 분쇄하였다. 상기 얻어진 감초 건조분쇄물 8 kg을 노르말 헥산:에탄올 (9:1, 부피비) 혼합 용매로 70℃에서 3시간동안 환류추출하였고 상기의 방법을 3회 반복하였다.

[0061] 상기 추출을 수행한 후, 추출된 시료는 Biotron Korea(대한민국)의 Modul spin 40을 이용하여 40℃에서 감압 농축을 수행하여, 330g의 감초 추출물 (이하 "HEGU"로 명명)를 얻었다.

[0062] 실험예 1: 감초 추출물(HEGU)의 암세포의 세포이동(migration) 억제 효과

[0063] 상기 실시예 1에서 얻어진 감초의 헥산/에탄올 추출물 (HEGU)의 암세포의 세포이동 (migration) 억제 효과를 측정하기 위하여, 전립선암 세포인 DU145 세포의 EGF(epidermal growth factor)에 의하여 유도되는 세포이동 (EGF-induced migration)에 대한 상기 감초 추출물의 효과를 시험하였다.

[0064] 본 발명자의 선행 연구 결과, 여러 가지 성장 인자 중 EGF가 DU145 세포의 세포이동을 현저하게 증가시키는 것을 확인한 바 있다 (Isoliquiritigenin inhibits migration and invasion of prostate cancer cells:

possible mediation by decreased JNK/AP-1 signaling. Kwon GT, Cho HJ, Chung WY, Park KK, Moon A, Park JH; J Nutr Biochem. 2009 Sep; 20(9):663-76. Epub 2008 Sep 27). 따라서, 본 시험예에서는 전립선암세포인 DU145 세포와 PC3세포, 마우스 유방암 세포인 4T1 세포, 마우스 대장암세포인 CT26, 및 마우스 폐암세포인 LLC 세포에 감초 추출물을 처리하거나, 이를 EGF와 같이 처리하고 이동된 세포를 관찰하여 감초 추출물이 암세포의 이동에 미치는 영향을 조사하였다.

[0065] DU145 세포 (the American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)를 1% charcoal stripped FBS (fetal bovine serum)를 포함하는 DMEM/F12 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)에서 24시간동안 혈청결핍(serum-deprived)시켰다. 6.5 mm transwell-filter (Corning Inc, corning, NY, USA)의 아래 부분을 Type IV collagen (Sigma, St.Louis, MO, USA)으로 pre-coating하였다. DU145 세포를 25000 cells/well의 양으로 위쪽 구획에 플레이팅하고, 여기에 상기 실시예 1에서 제조된 감초 추출물(HEGU)를 0 내지 7.5 μ g/mL의 농도로 처리하였다. 아래쪽 구획은 0.1% BSA (Bovine serum albumin)와 1% charcoal stripped FBS (fetal bovine serum)를 포함하는 DMEM/F12(Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)로 채우고, EGF (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) 10 ng/mL를 첨가하거나 첨가하지 않고 준비하였다. 상기 세포를 37°C에서 4 시간동안 배양하고, 이동한 세포를 hematoxylin and eosin (H&E)으로 염색하였다.

[0066] 도 1a는 상기 H&E 염색된 세포를 보여주는 사진이다 (x100). 도 1b는 상기 관찰된 이동된 세포의 수를 측정하여 나타낸 그래프이다 (Each bar represents the mean $\pm$ SEM (n = 3)). Means without a common letter differ, $P < 0.05$.

[0067] 도 1a 및 b에 나타난 바와 같이, EGF 처리 없이 HEGU만 처리시, 7.5 μ g/mL 농도의 HEGU는 DU145 세포의 이동을 현저하게 감소시켰다. 한편, EGF와 함께 HEGU 처리시, DU145 세포의 이동은 10 ng/mL의 EGF에 의해서 현저하게 증가하였고, EGF에 의해 증가된 세포의 이동은 HEGU의 처리에 의해 HEGU 농도 의존적으로 억제되는 것으로 나타났다.

[0068] 또한, PC3 세포 (the American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)를 1% charcoal stripped FBS (fetal bovine serum)를 포함하는 DMEM/F12 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)에서 24시간동안 혈청결핍(serum-deprived)시켰다. 6.5 mm transwell-filter (Corning Inc, corning, NY, USA)의 아래 부분을 Type IV collagen (Sigma, St.Louis, MO, USA)으로 pre-coating하였다. PC3 세포를 25000 cells/well의 양으로 위쪽 구획에 플레이팅하고, 여기에 상기 실시예 1에서 제조된 감초 추출물(HEGU)를 0 내지 7.5 μ g/mL의 농도로 처리하였다. 아래쪽 구획은 0.1% BSA (Bovine serum albumin)와 1% charcoal stripped FBS (fetal bovine serum)를 포함하는 DMEM/F12(Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)로 채우고, EGF (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) 10 ng/mL를 첨가하거나 첨가하지 않고 준비하였다. 상기 세포를 37°C에서 4 시간동안 배양하고, 이동한 세포를 hematoxylin and eosin (H&E)으로 염색하였다.

[0069] 상기 얻어진 결과를 도 9a 및 9b에 나타내었다. 도 9a는 상기 H&E 염색된 세포를 보여주는 사진이고 (x100), 도 9b는 상기 관찰된 이동된 세포의 수를 측정하여 나타낸 그래프이다 (Each bar represents the mean $\pm$ SEM (n = 3)). Means without a common letter differ, $P < 0.05$. 도 9a 및 9b에 나타난 바와 같이, HEGU는 DU145 세포와 마찬가지로 PC3 세포의 이동 역시 현저하게 감소시켰으며 EGF를 처리한 경우와 처리하지 않은 경우 모두에서 유의적인 감소를 보였다.

[0070] 또한, 마우스 유방암세포인 4T1 세포 (The American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)를 1% charcoal stripped FBS (fetal bovine serum)를 포함하는 DMEM (WelGENE, Dagu, Korea)에서 24시간동안 혈청결핍(serum-deprived)시켰다. 6.5 mm transwell-filter (Corning Inc, corning, NY, USA)의 아래 부분을 Type IV collagen (Sigma, St.Louis, MO, USA)으로 pre-coating하였다. 4T1 세포를 25000 cells/well의 양으로 위쪽 구획에 플레이팅하고, 여기에 상기 실시예 1에서 제조된 감초 추출물(HEGU)를 0 내지 7.5 μ g/mL의 농도로 처리하였다. 아래쪽 구획은 10% gelatinase free FBS (fetal bovine serum)를 포함하는 DMEM (WelGENE, Dagu, Korea)로 채웠다. 상기 세포를 37°C에서 18 시간동안 배양하고, 이동한 세포를 hematoxylin and eosin (H&E)으로 염색하였다.

[0071] 상기 얻어진 결과를 도 10a 및 10b에 나타내었다. 도 10a는 상기 H&E 염색된 세포를 보여주는 사진이고(x100), 도 10b는 상기 관찰된 이동된 세포의 수를 측정하여 나타낸 그래프이다 (Each bar represents the mean $\pm$ SEM (n = 3)). Means without a common letter differ, $P < 0.05$. 도 10a 및 10b에 나타난 바와 같이, HEGU는 mouse 유래의 유방암 세포인 4T1 세포의 이동을 농도의존적으로 감소시킴을 확인하였다.

- [0072] 또한, 마우스 대장암세포인 CT26 세포 (The American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)를 1% charcoal stripped FBS (fetal bovine serum)를 포함하는 DMEM (WelGENE, Dagu, Korea)에서 24시간 동안 혈청 결핍(serum-deprived)시켰다. 6.5 mm transwell-filter (Corning Inc, corning, NY, USA)의 아래 부분을 Type IV collagen (Sigma, St.Louis, MO, USA)으로 pre-coating하였다. CT26 세포를 25000 cells/well의 양으로 위쪽 구획에 플레이팅하고, 여기에 상기 실시예 1에서 제조된 감초 추출물(HEGU)를 0 내지 7.5 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였다. 아래쪽 구획은 0.1% BSA (Bovine serum albumin)와 1% charcoal stripped FBS (fetal bovine serum)를 포함하는 DMEM (WelGENE, Dagu, Korea)로 채웠다. 상기 세포를 37°C에서 4 시간 동안 배양하고, 이동한 세포를 hematoxylin and eosin (H&E)으로 염색하였다.
- [0073] 상기 얻어진 결과를 도 11a 및 11b에 나타내었다. 도 11a는 상기 H&E 염색된 세포를 보여주는 사진이고(x100), 도 11b는 상기 관찰된 이동된 세포의 수를 측정하여 나타낸 그래프이다 (Each bar represents the mean $\pm$ SEM (n = 3)). Means without a common letter differ, $P < 0.05$. 도 11a 및 11b에 나타난 바와 같이, HEGU는 mouse 유래의 대장암 세포인 CT26 세포의 이동을 7.5 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 감소시킴을 확인하였다.
- [0074] 또한, 마우스 폐암세포인 LLC 세포 (The American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)를 1% charcoal stripped FBS (fetal bovine serum)를 포함하는 DMEM (WelGENE, Dagu, Korea)에서 24시간 동안 혈청 결핍(serum-deprived)시켰다. 6.5 mm transwell-filter (Corning Inc, corning, NY, USA)의 아래 부분을 Type IV collagen (Sigma, St.Louis, MO, USA)으로 pre-coating하였다. LLC 세포를 25000 cells/well의 양으로 위쪽 구획에 플레이팅하고, 여기에 상기 실시예 1에서 제조된 감초 추출물(HEGU)를 0 내지 7.5 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였다. 아래쪽 구획은 0.1% BSA (Bovine serum albumin)와 1% charcoal stripped FBS (fetal bovine serum)를 포함하는 DMEM (WelGENE, Dagu, Korea)으로 채웠다. 상기 세포를 37°C에서 6 시간 동안 배양하고, 이동한 세포를 hematoxylin and eosin (H&E)으로 염색하였다.
- [0075] 상기 얻어진 결과를 도 12a 및 12b에 나타내었다. 도 12a는 상기 H&E 염색된 세포를 보여주는 사진이고(x100), 도 12b는 상기 관찰된 이동된 세포의 수를 측정하여 나타낸 그래프이다 (Each bar represents the mean $\pm$ SEM (n = 3)). Means without a common letter differ, $P < 0.05$. 도 12a 및 12b에 나타난 바와 같이, HEGU는 mouse 유래의 폐암 세포인 LLC 세포의 이동을 농도의존적으로 감소시킴을 확인하였다.
- [0076] **실험예 2: 감초 추출물(HEGU)의 암세포의 침윤(invasion) 억제 효과**
- [0077] 상기 실시예 1에서 얻어진 감초의 핵산/에탄올 추출물 (HEGU)의 암세포의 침윤 (invasion) 억제 효과를 측정하기 위하여, 전립선암 세포인 DU145 세포에서 EGF(epidermal growth factor)에 의하여 유도되는 침윤 (EGF-induced invasion)에 대한 상기 감초 추출물의 효과를 시험하였다.
- [0078] 암세포가 전이하기 위해서는 이동된 암세포가 새로운 조직에 부착하고 침윤하는 과정이 필요하다. 상기 실시예 2의 결과를 통해 HEGU에 의해 암세포의 이동이 억제됨을 확인하였으므로, HEGU가 암세포의 침윤에 미치는 영향을 matrigel이 코팅된 transwell을 사용하여 조사하였다.
- [0079] DU145 세포를 1% charcoal stripped FBS (fetal bovine serum)를 포함하는 DMEM/F12에서 24시간동안 혈청결핍(serum-deprived)시켰다. 6.5 mm matrigel-coated transwell-filter (BD Biosciences, SanJose,CA)에 DU145 세포를 25000 cells/well의 양으로 플레이팅하고, 여기에 상기 실시예 1에서 제조된 감초 추출물(HEGU)를 0 내지 7.5 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였다. 아래쪽 구획은 0.1% BSA (Bovine serum albumin)와 1% charcoal stripped FBS (fetal bovine serum)를 포함하는 DMEM/F12로 채우고, EGF 10 ng/mL를 첨가하거나 첨가하지 않고 준비하였다. 상기 세포를 37°C에서 14 시간동안 배양하고, 침윤된 세포를 hematoxylin and eosin (H&E)으로 염색하였다.
- [0080] 도 2a는 상기 H&E 염색된 세포를 보여주는 사진이다 (x100). 도 2b는 상기 침윤 세포수를 측정하여 나타낸 그래프이다. (Each bar represents the mean $\pm$ SEM (n = 3). Means without a common letter differ, $P < 0.05$.)
- [0081] 도 2a 및 2b에 나타난 바와 같이, EGF를 처리한 경우와 처리하지 않은 경우를 비교할 때, EGF 첨가시 EGF에 의해 DU145 세포의 침윤이 증가하였고, 증가된 세포의 침윤은 HEGU 처리에 의해 농도 의존적으로 억제되었다. HEGU의 DU145 세포 침윤 억제 효과는 EGF를 처리하지 않은 경우에도 확인할 수 있다.
- [0082] **실험예 3: 감초 추출물(HEGU)이 암세포에서 EGF에 의해 유도된 (EGF-induced) MMPs, TIMPs, uPA 및 VEGF의 분**

비(secretion) 조절 효과

- [0083] 상기 실시예 1에서 얻어진 감초 추출물(HEGU)이 암세포에서 EGF에 의해 유도된 (EGF-induced) 기질 메탈로프로테나제 (matrix metalloproteinases, MMPs), 메탈로프로테나제 조직 억제제 (tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs), 유로카이네이즈 유형 플라스미노겐 활성화제 (urokinase-type plasminogen activator, uPA) 및 혈관내피세포 성장인자 (Vascular endothelial growth factor, VEGF)의 분비 (secretion)에 미치는 영향을 시험하기 위하여, 전립선암 세포인 DU145 세포에서 EGF에 의하여 유도되는 MMPs, TIMPs, uPA 및 VEGF의 발현 및 분비에 대한 상기 감초 추출물의 효과를 시험하였다.
- [0084] 암세포에 의한 세포외기질 (extracellular matrix, ECM)의 분해는 전이의 중요한 과정으로 ECM의 분해는 MMPs와 MMP의 활성을 저해하는 단백질인 TIMPs에 의해 조절된다. 따라서 DU145 세포에서 MMPs와 TIMPs의 발현에 대한 HEGU의 효능을 조사하였다.
- [0085] DU145 세포를 100 mm dish에 2×10^6 cells/dish의 양으로 플레이팅하였다. 상기 세포 배양액으로 10% FBS가 보충된 DMEM/F12를 사용하여 37°C에서 배양하였다. 하루가 지난 후에, 생성된 단일층을 무혈청 DMEM/F12 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)에서 24시간동안 혈청결핍 (serum-starved)시켰다. 상기 세포를 무혈청 배지 (serum-free media, 무혈청 DMEM/F12)에서 0 내지 7.5 $\mu\text{g/mL}$ 의 HEGU와 함께 18시간동안 37°C에서 배양하였다. 이때 EGF 10ng/mL를 처리한 군과 처리하지 않은 군으로 나누어 시험하였다.
- [0086] 18시간 후, 배지를 수집하고 농축하여 젤라틴 자이모그래피 (gelatin zymography)와 웨스턴블라팅 (Western blotting)을 수행하였다. 보다 구체적으로 1% gelatin이 포함된 7.5% acrylamide gel을 이용하여 세포배양에 함유된 단백질을 SDS-PAGE 방법으로 분리시켰다. 단백질이 분리되어 있는 gel은 2.5% Triton X-100 용액으로 30분간 2번 씻어 SDS를 제거하였다. 그리고 나서, zymogen activation buffer (50 mmol/L Tris-HCl, 0.02% Brij 35, 5 mmol/L CaCl_2 and 0.2 mmol/L NaCl)로 두 번 씻어준 후 같은 buffer로 37°C에서 48시간 반응시켰다. 반응이 끝난 gel을 0.25% 쿠마시블루 (Coomassie Blue) 용액으로 염색 및 탈색하였다. 겔에 로딩된 세포 배양액은 동량의 단백질이 함유되도록 그 부피를 조절하였다.
- [0087] 상기 자이모그래피에서 얻어진 쿠마시블루로 염색된 겔 사진(3번의 독립적 실험 결과)을 도 3a에, 웨스턴블라팅에서 얻어진 블랏의 화학적 발광반응 (chemiluminescent) 결과(3번의 독립적 실험 결과)를 도 3b에 나타내었다. 상기 웨스턴블라팅 결과(3b)에서 보여지는 각각의 밴드의 상대적 양은 노출된 필름의 densitometric scanning (Bio-profile Bio-1D application; Vilber-Lourmat, Marine LaVallee, France)를 통하여 측정하였다. 각 밴드의 조정된 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ ($n = 3$)을 각 블랏에 나타내었다. (Means without a common letter differ, $P < 0.05$).
- [0088] 도 3a에 나타난 바와 같이, DU145 세포에 HEGU를 처리하고 18시간 conditioned medium을 사용하여 zymography를 수행한 결과, HEGU 7.5 $\mu\text{g/mL}$ 처리시 pro MMP-9과 active MMP-9의 활성이 현저하게 억제되었으며, EGF에 의해 유도된 MMP-9의 활성이 HEGU의 농도 의존적으로 억제되었다. Pro-MMP-2의 EGF에 의한 증가는 MMP-9의 경우 보다는 미미하였으나, HEGU의 처리에 의해 그 수준이 현저하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 45 kDa에 나타난 밴드는 MMP-2의 activation byproduct로써 EGF에 의해 소량 증가하였고 HEGU의 처리에 의해 농도 의존적으로 감소하였다.
- [0089] 또한, 단백질 발현을 확인하기 위하여 Western blot을 수행한 결과를 나타난 도 3b에서 알 수 있는 바와 같이, HEGU의 처리에 의해 MMP-9과 TIMP-1의 단백질 발현이 현저히 감소하였다. EGF에 의해 증가된 MMP-9과 TIMP-1의 수준도 HEGU에 의하여 농도의존적으로 감소한 반면, EGF 처리에 의해 감소한 TIMP-2는 HEGU의 농도가 증가함에 따라 그 수준이 증가하였고, 이러한 효과는 EGF를 처리하지 않은 경우에도 확인되었다. 한편, Extracellular matrix의 분해에는 MMPs 이외에도 serine protease인 유로키네이즈-유형 플라스미노겐 활성화제 (urokinase-type plasminogen activator, uPA)가 관여한다고 알려져 있다.
- [0090] Western blot 결과 세 종류의 band가 관찰되었다. 이 중에서, 52 kDa의 uPA는 pro form, 33 kDa의 uPA는 active form으로 알려져 있으며, Pro uPA와 active uPA 모두 HEGU에 의해 발현이 억제 되고, EGF에 의해 증가한 이들 uPA 단백질의 발현 역시 HEGU에 의해 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다. 혈관내피세포 성장인자 (Vascular endothelial growth factor, VEGF)는 암전이에서 필수적인 단계인 신생혈관생성에 있어서 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며, HEGU는 EGF에 의해 증가된 VEGF의 단백질 발현을 농도의존적으로 감소시키며, EGF를 처리하지 않았을 경우에도 HEGU의 VEGF 단백질 발현 억제 효과가 나타남을 확인하였다.

- [0091] **실험예 4: 감초 추출물(HEGU)의 암세포에서 EGF에 의해 유도된 세포 부착 (EGF-induced cell adhesion) 억제 효과**
- [0092] 상기 실시예 1에서 얻어진 감초의 헥산/에탄올 추출물 (HEGU)의 암세포의 세포부착 (cell adhesion) 억제 효과를 측정하기 위하여, 전립선암 세포인 DU145 세포에서 EGF(epidermal growth factor)에 의하여 유도되는 세포부착 (EGF-induced cell adhesion)에 대한 감초 추출물의 효과를 시험하였다.
- [0093] Adhesion은 암세포의 침윤과 전이에서 중요한 역할을 담당한다. 앞에서 HEGU가 암세포의 이동 및 침윤을 억제함을 확인하였으므로 암세포의 부착능에 대한 HEGU의 영향을 조사하였다.
- [0094] DU145 세포를 1% charcoal stripped FBS가 함유된 DMEM/F12 배지로 37℃에서 24시간동안 혈청 결핍시켰다. 상기 세포를 CytoMatrix™ human collagen I cell adhesion strips (Chemicon International, Temecula, CA, USA)에 4×10^5 cells/well로 플레이팅하였다. 상기 세포를 1% charcoal-stripped FBS 함유 DMEM/F12 배지에서 0 내지 7.5 μ g/mL의 HEGU와 함께 37℃에서 45분간 배양하였다. 이때, EGF 10ng/mL를 처리한 군과 처리하지 않은 군으로 나누어서 시험하였다. 그리고 나서, 상기 세포를 0.2% crystal violet (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)으로 염색하고 세포 부착된 세포주의 수를 측정색정(colorimetric analysis) 하였다 (Each bar represents the mean $\pm$ SEM (n = 4)). 상기 결과를 도 4a에 나타내었다.
- [0095] 상기와 같이 Human collagen type I 이 코팅된 plate에 부착된 DU145 세포의 수를 정량한 결과, 도 4a에 나타난 바와 같이, EGF에 의해 DU145 세포의 부착이 유의적으로 증가되었으며, HEGU의 처리는 EGF에 의해 증가된 DU145 세포의 부착을 농도 의존적으로 감소시켰다. DU145 세포의 부착을 억제하는 HEGU의 효과는 EGF를 처리하지 않은 경우에도 확인할 수 있었다.
- [0096] 이와 같이, HEGU의 암세포 부착능 억제를 확인하였으므로, 이와 관련된 adhesion molecule의 변화에 미치는 HEGU의 효과를 다음과 같이 웨스턴블라팅을 통하여 확인하였다.
- [0097] DU145 세포를 실험예 3과 동일하게 플레이팅 및 혈청결핍시키고, HEGU를 처리하였다. 전체 세포 용해물을 integrin- α 2, ICAM (Intercellular adhesion molecule), 및 VCAM (vascular cell adhesion molecule) 항체 (상기 모든 항체는 'Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA'에서 구입함)를 사용하여 면역블로팅하였다. 상기 면역블로팅 결과 얻어진 블랏의 화학발광반응 사진을 도 4b에 나타내었다 (3번의 독립적 실험 결과). 각 밴드의 강도는 노출된 필름의 densitometric scanning을 통하여 측정하고, 발현 수준을 β -actin으로 조정하였다. 각 밴드의 조정된 mean $\pm$ SEM (n = 3)을 각 블랏에 나타내었다. (Means without a common letter differ, $P < 0.05$.)
- [0098] 4b에서 보는 바와 같이, HEGU는 부착 분자(adhesion molecule)로 알려진 integrin- α 2, ICAM, 및 VCAM의 발현을 감소시켰으며, EGF에 의해 증가된 이들 부착분자의 발현도 유의적으로 감소시킴을 확인할 수 있다.
- [0099] **실시예 2: 감초 추출물의 분획물 제조**
- [0100] 상기 결과를 종합하면, 감초 추출물은 MMP-9, MMP-2, TIMP-1, uPA, VEGF 단백질의 분비 감소와 TIMP-2 단백질의 분비 증가 및 integrin- α 2, ICAM, VCAM 등의 부착분자의 발현 억제를 통해 암세포의 이동, 침윤, 부착을 억제하는 것으로 확인되었다. 이러한 역할을 하는 감초 추출물(HEGU)의 활성성분을 확인하기 위하여 HEGU를 분획하고 각각의 분획물들이 암세포의 이동에 미치는 영향을 migration assay를 통해 확인하였다. 우선 아래와 같은 방법으로 분획물을 제조하였다.
- [0101] 감초추출물(HEGU) 330 g 중 일부 88 g을 노르말헥산:에틸아세테이트 950:50~ 700:300(부피비 기준)까지 농도구배로 실리카젤 (Fuji silysia LTD., Japan)을 고정상으로 칼럼크로마토그래피를 수행하여 분취한 후, TLC(박층 크로마토그래피)로 화합물의 이동거리가 유사한 것을 분취하여 125개의 소분획물로 분획하였다. 그 중 활성을 갖는 분획물 64 (노르말헥산:에틸아세테이트=12:1, 86.5 mg), 76 (노르말헥산:에틸아세테이트=10:1, 268 mg), 80 (노르말헥산:에틸아세테이트=10:1, 234 mg), 89 (노르말헥산:에틸아세테이트=6:1, 3,0842 mg), 91 (노르말헥산:에틸아세테이트=6:1, 991mg), 96 (노르말헥산:에틸아세테이트=4:1, 1,145mg), 및 105 (노르말헥산:에틸아세테이트=7:2, 1,104mg)을 얻었다 (도 5A 참조, 분획용매 혼합비는 모두 부피 기준임).
- [0102] 상기 분획물 중 효과가 우수한 것으로 나타난 89 분획물 2.5 g을 중압 크로마토그래피를 이용하여 고정상으로 Cosmosil 140C18-prep (Nacalai tesque INC., Japan)을 용매로는 메탄올 10-100%(v/v) 농도구배로 분리하여 다

음과 같이 총 20개의 소분획물을 얻었다: 1 (메탄올 10%(v/v), 3 mg), 2 (메탄올 10%(v/v), 5.2 mg), 3 (메탄올 20%(v/v), 5.5 mg), 4 (메탄올 30%(v/v), 5.3 mg), 5 (메탄올 30%(v/v), 4.4 mg), 6 (메탄올 40%(v/v), 5.8 mg), 7 (메탄올 40%(v/v), 5.8 mg), 8 (메탄올 50%(v/v), 2.3 mg), 9 (메탄올 50%(v/v), 5 mg), 10 (메탄올 50%(v/v), 1.4 mg), 11 (메탄올 50%(v/v), 5.9 mg), 12 (메탄올 50%(v/v), 1.5 mg), 13 (메탄올 50%(v/v), 5.1 mg), 14 (메탄올 60%(v/v), 3.5 mg), 15 (메탄올 70%(v/v), 1 mg), 16 (메탄올 70%(v/v), 1.9 mg), 17 (메탄올 80%(v/v), 0.5 mg), 18 (메탄올 80%(v/v), 5.2 mg), 19 (메탄올 80%(v/v), 0.8 mg), 및 20 (메탄올 100%(v/v), 3.0 mg) (도 5B 참조).

[0103] 실험예 5: 감초 추출물(HEGU) 분획물 및 소분획물의 암세포의 세포이동(migration) 억제 효과

[0104] 상기 시험예 1과 동일하게 DU145 세포를 플레이팅하고, 혈청 결핍시켰다. 그리고 난 후, 여기에 상기 실시예 2에서 얻어진 분획물을 각각 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 녹여서 5 µg/mL의 농도로 처리하였다. 아래쪽 구획은 0.1% BSA (Bovine serum albumin)와 1% charcoal stripped FBS (fetal bovine serum)를 포함하는 DMEM/F12로 채우고, EGF 10 ng/mL를 첨가하거나 첨가하지 않고 준비하였다. 상기 세포를 37°C에서 4 시간동안 배양하고, 이동한 세포를 hematoxylin and eosin (H&E)으로 염색하였다. 상기 H&E 염색된 이동된 세포 개수를 측정하여도 5에 나타내었다. 도 5의 A는 분획물 64, 76, 80, 89, 91, 96 및 105에 대한 결과이며, B는 상기 분획물들 중 가장 우수한 효과를 나타낸 분획물 89의 소분획물 1-20에 대한 결과이다 (Each bar represents the mean ± SEM (n = 3)). Control은 DMSO만을 처리하고 DU145 세포의 이동을 확인한 것이다.

[0105] 도 5에서 확인되는 바와 같이, 분획물 64, 76, 80, 89, 91, 96 및 105는 모두 감초 추출물 (HEGU)와 동등 이상의 암세포 이동 억제 효과를 나타내며, 특히 분획물 89가 가장 우수한 효과를 나타내었다. 또한 상기 분획물 89의 소분획물 1-20 중 소분획물 5-13 및 17-19는 감초 추출물 (HEGU)와 동등 이상의 암세포 이동 억제 효과를 나타내고, 이중에서도 소분획물 6-11, 18 및 19는 분획물 89보다 우수한 암세포 이동 억제효과를 나타내며, 특히 소분획물 7이 가장 우수한 암세포 이동 억제 효과를 나타내었다.

[0106] 실시예 3: 화합물의 분리, 정제 및 동정

[0107] 상기 실험예 5에서 우수한 효과를 보인 소분획물 6 내지 9의 HPLC 스펙트럼 결과를 도 8에 나타내었다. HPLC 조건은 다음과 같이 하였다:

HPLC (Thermo Electron co., USA)		Conditions	
Column	Agilent Eclipse XDB-C18 reverse-phase (4.6×150mm, 5μm)		
Mobile phase	A: 0.1% formic acid in water B: Acetonitrile		
Detector : 254, 220, 280 nm		Flow rate : 0.7 ml/min	
Time(min)	A (%)	B (%)	
0	58	42	
10	58	42	
12	45	55	
17	40	60	
25	40	60	
28	0	100	
32	58	42	
42	58	42	

[0109] 또한, 상기 실험예 5에서 가장 우수한 효과를 보인 것으로 나타난 소분획물 7로부터 유효성분을 다음과 같이 동정하였다. 도 8에서 확인되는 바와 같이 소분획물 7의 HPLC 분석에서 순도가 높아서, 추가 정제 없이 NMR 분석으로 구조를 동정하였다.

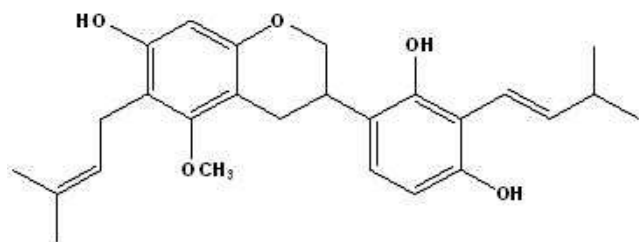
[0110] ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 1.66, 1.67, 1.76, 1.77 (each 3H, s, CH₃), 2.72 (1H, dd, 16.0 and 11.0 Hz, H-4ax) 2.90 (1H, ddd, 16.0, 5.1, and 1.8 Hz, H-4eq), 3.23 (2H, t, J = 7.2 Hz, H-9), 3.36 (2H, br d, J = 7.0 Hz, H-7'), 3.32 (1H, m, H-3), 3.67 (3H, s, OCH₃), 3.89 (1H, t, J = 10.2 Hz, H-2ax), 4.18 (2H,

ddd, J = 2.0, 3.1, and 10.2 Hz, H-2eq), 5.19 (2H, m, H-10 and H-8'), 6.09(1H, s, H-8), 6.35 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-5'), 6.75(1H, d, J = 8.4 Hz, H-6').

[0111] ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ 158.47 (C-5), 155.90 (C-7), 155.71 (C-4'), 154.78 (C-8a), 154.31 (C-2'), 132.07 (C-9'), 130.84 (C-11), 125.61 (C-8'), 125.27 (C-10), 124.33 (C6'), 121.62 (C-1'), 117.60(C-3'), 115.12 (C-4a), 108.72 (C-5'), 108.61 (C-6), 100.05 (C-8), 71.26 (C-2), 60.95 (OCH₃), 32.79 (C-3), 27.43 (C-4), 26.01 (C-11'), 25.96 (C-13), 23.63 (C-7', 9), 18.02(C-10'), 17.97(C-12).

[0112] Molecular Formula C₂₆H₃₂O₅, Molecular Weight 424

[0113] <화학식 1>



[0114]

[0115] 실험예 6: 리코리시딘(licoricidin)의 암세포의 세포이동(migration) 억제 효과

[0116] 상기 실시예 3과 같이 감초 추출물(HEGU)의 유효분획 성분이 리코리시딘(licoricidin)임을 확인하고 리코리시딘이 실제로 암세포 전이를 효과적으로 억제하는지 여부를 다음과 같이 시험하였다.

[0117] 상기 실험예 1과 동일하게 DU145 세포를 플레이트팅하고 혈청을 결핍시켰다. 그리고 난 후, 여기에 상기 실시예 3에서 얻어진 리코리시딘 화합물을 0 내지 5 µg/mL의 농도로 처리하였다. 아래쪽 구획은 0.1% BSA (Bovine serum albumin)와 1% charcoal stripped FBS (fetal bovine serum)를 포함하는 DMEM/F12로 채우고, EGF 10 ng/mL를 첨가하거나 첨가하지 않고 준비하였다. 상기 세포를 37°C에서 4 시간동안 배양하고, 이동한 세포를 hematoxylin and eosin (H&E)으로 염색하였다.

[0118] 상기 H&E 염색된 세포 사진을 도 6a에 나타내고 (x100), 상기 이동된 세포 개수를 측정하여 도 6b에 나타내었다 (Each bar represents the mean±SEM (n = 3). Means without a common letter differ, P< 0.05). 도 6a 및 6b에 나타난 바와 같이, 리코리시딘은 2.5, 5 µg/mL의 농도에서 DU145 세포의 이동을 현저하게 감소시켰으며, EGF에 의해 증가된 세포의 이동 또한 리코리시딘 처리에 의하여 농도의존적으로 억제되는 것으로 관찰되었다.

[0119] 상기 실험예 1과 동일하게 CT26 세포를 플레이트팅하고 혈청을 결핍시켰다. 그리고 난 후, 여기에 상기 실시예 3에서 얻어진 리코리시딘 화합물을 0 내지 5 µg/mL의 농도로 처리하였다. 아래쪽 구획은 0.1% BSA (Bovine serum albumin)와 1% charcoal stripped FBS (fetal bovine serum)를 포함하는 DMEM (WelGENE, Dagu, Korea)으로 채웠다. 상기 세포를 37°C에서 4 시간 동안 배양하고, 이동한 세포를 hematoxylin and eosin (H&E)으로 염색하였다.

[0120] 상기 H&E 염색된 세포 사진을 도 13a에 나타내고 (x100), 상기 이동된 세포 개수를 측정하여 도 13b에 나타내었다 (Each bar represents the mean±SEM (n = 3). Means without a common letter differ, P< 0.05). 도 13a 및 13b에 나타난 바와 같이, 리코리시딘은 농도의존적으로 CT26 세포의 이동을 현저하게 감소시키는 것으로 관찰되었다.

[0121] 또한, 상기 실험예 1과 동일하게 LLC 세포를 플레이트팅하고 혈청을 결핍시켰다. 그리고 난 후, 여기에 상기 실시예 3에서 얻어진 리코리시딘 화합물을 0 내지 5 µg/mL의 농도로 처리하였다. 아래쪽 구획은 0.1% BSA (Bovine serum albumin)와 1% charcoal stripped FBS (fetal bovine serum)를 포함하는 DMEM (WelGENE, Dagu, Korea)으로 채웠다. 상기 세포를 37°C에서 6 시간 동안 배양하고, 이동한 세포를 hematoxylin and eosin (H&E)으로 염색하였다.

[0122] 상기 H&E 염색된 세포 사진을 도 14a에 나타내고 (x100), 상기 이동된 세포 개수를 측정하여 도 14b에 나타내었다 (Each bar represents the mean±SEM (n = 3). Means without a common letter differ, P< 0.05). 도 14a

및 14b에 나타난 바와 같이, 리코리시딘은 농도의존적으로, 특히 2.5, 5 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 LLC 세포의 이동을 현저하게 감소시키는 것으로 관찰되었다.

[0123] 실험예 7: 리코리시딘(licoricidin)의 암세포에서 EGF에 의해 유도된 단백질 발현 억제 효과

[0124] 리코리시딘이 암전이와 관련된 단백질의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여, DU145 세포에 리코리시딘을 처리하고 MMP-9, TIMP-1, uPA, 및 VEGF 분비량과 integrin- $\alpha 2$, ICAM, 및 VCAM의 발현량을 측정하였다.

[0125] 상기 실험예 3과 동일한 방법으로 DU145 세포를 플레이트팅하고 혈청 결핍시켰다. 상기 세포를 0 내지 5 $\mu\text{g/mL}$ 의 리코리시딘과 함께 무혈청 배지 (DMEM/F12, Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)에서 18시간 동안 배양하였다. 이 때, EGF 10ng/mL를 처리한 군과 처리하지 않은 군으로 나누어 시험하였다.

[0126] 18시간 후, 배지를 수집하고 농축하여 웨스턴블로팅하였다. 겔에 로딩된 세포 배양액은 동량의 단백질이 함유되도록 그 부피를 조절하였다. 얻어진 결과를 도 7a에 나타내었다. 도 7a에 나타난 바와 같이, 라이코리시딘은 감초 추출물 (HEGU)보다 낮은 농도에서도 MMP-9, TIMP-1, uPA, 및 VEGF의 분비를 현저하게 억제하고, 이러한 감소 효과는 EGF에 의하여 증가된 경우에도 확인할 수 있었다. 또한, MMP 효소 기능을 억제 하는 것으로 알려진 TIMP-2는 리코리시딘에 의하여 분비가 증가함을 확인하였다.

[0127] 즉, 리코리시딘은 감초추출물 (HEGU)의 유효성분 중 하나로, 인간의 전립선암세포인 DU145의 이동을 감소시키고 MMP-9, TIMP-1, uPA, VEGF의 감소 및 TIMP-2의 증가를 유도함으로써 전이를 억제하는 효능을 보임을 확인할 수 있다.

[0128] 또한, 상기 얻어진 전세포 용해물을 integrin- $\alpha 2$, ICAM 및 VCAM 항체 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 사용하여 면역블로팅하였다. 상기 면역블로팅 결과 얻어진 블랏의 화학발광반응 사진을 도 7b에 나타내었다 (3번 실험). 각 밴드의 강도는 노출된 필름의 densitometric scanning을 통하여 측정하고, 발현 수준은 β -actin을 기준으로 조정하였다. 각 밴드의 조정된 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ ($n = 3$)을 각 블랏에 나타내었다. (Means without a common letter differ, $P < 0.05$.)

[0129] 도 7b에 나타난 바와 같이, 리코리시딘은 부착 분자에 대해서도 억제 효과를 갖는 것으로 관찰되었는 바, integrin- $\alpha 2$, ICAM, 및 VCAM의 발현을 현저하게 감소시켰으며 EGF를 처리한 경우에도 감소효과가 농도의존적으로 나타났다.

[0130] 실시예 4: 감초 추출물을 포함하는 건강기능식품의 제조

[0131] 실시예 1의 감초 추출물을 포함하는 건강식품을 하기 표 1과 같이 원료를 혼합하여 제조하였다.

표 1

성분	합량
감초 추출물 분말	1000 mg
비타민 혼합물	적량
비타민 A 아세테이트	70 μg
비타민 E	1.0 mg
비타민 B1	0.13 mg
비타민 B2	0.15 mg
비타민 B6	0.5 mg
비타민 B12	0.2 μg
비타민 C	10 mg
비오틴	10 μg
니코틴산아미드	1.7 mg
엽산	50 μg
판토텐산 칼슘	0.5 mg
무기질 혼합물	적량
황산제1철	1.75 mg
산화아연	0.82 mg
탄산마그네슘	25.3 mg

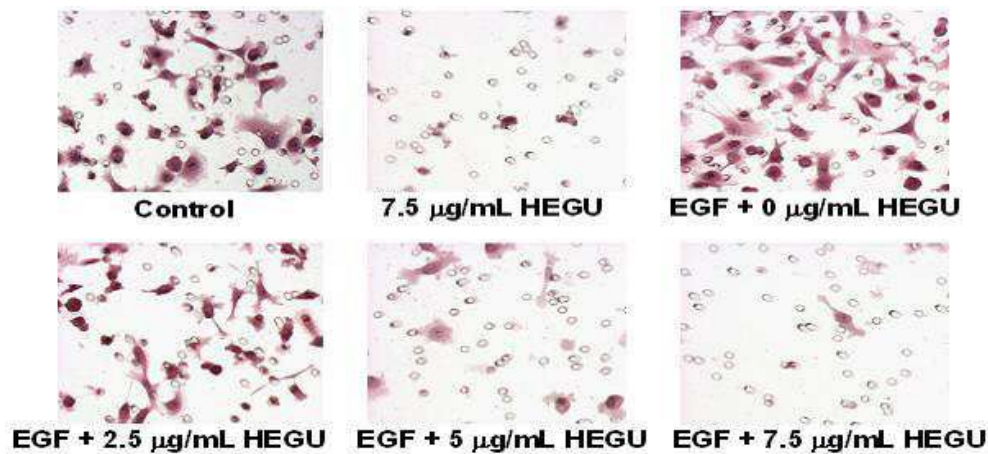
제1인산칼륨	15 mg
제2인산칼슘	55 mg
구연산칼륨	90 mg
탄산칼슘	100 mg
엽화마그네슘	24.8 mg

[0133] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

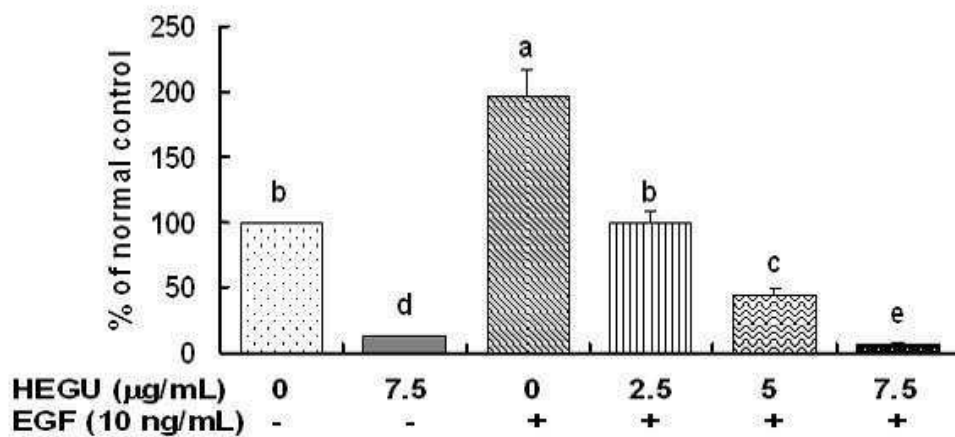
[0134] 이상에서 살펴본 바와 같이, 상기와 같은 감초 추출물, 분획물, 소분획물 및 이로부터 분리된 리코리시딘은 암 세포 전이 억제 활성을 가짐으로써 암 전이의 예방 및/또는 치료용 조성물로서 유용하게 사용될 수 있다.

도면

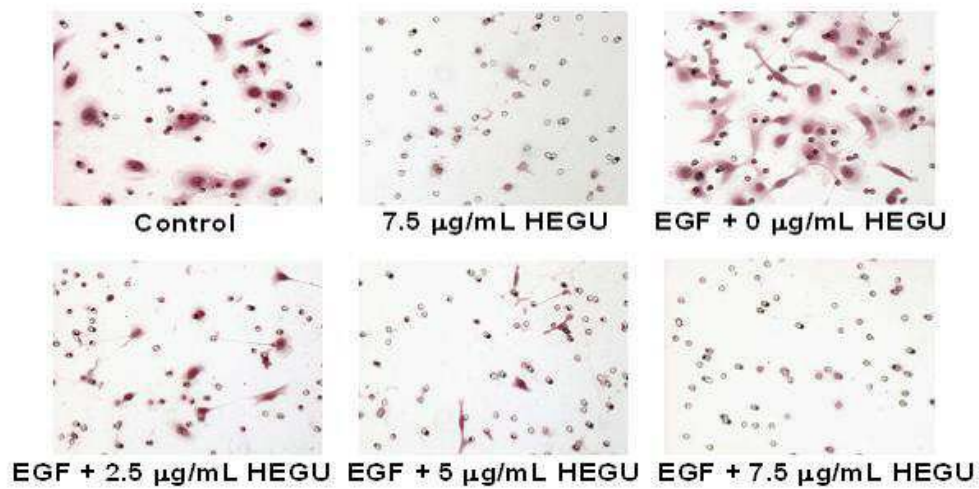
도면1a



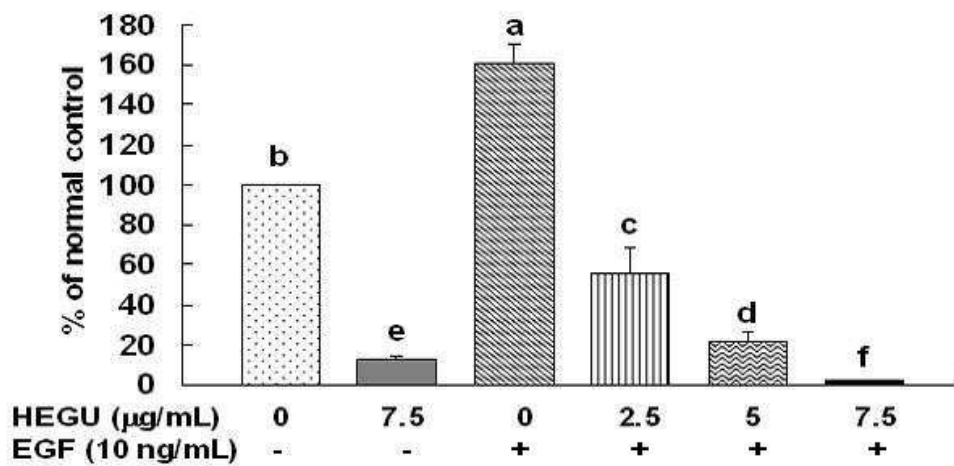
도면1b



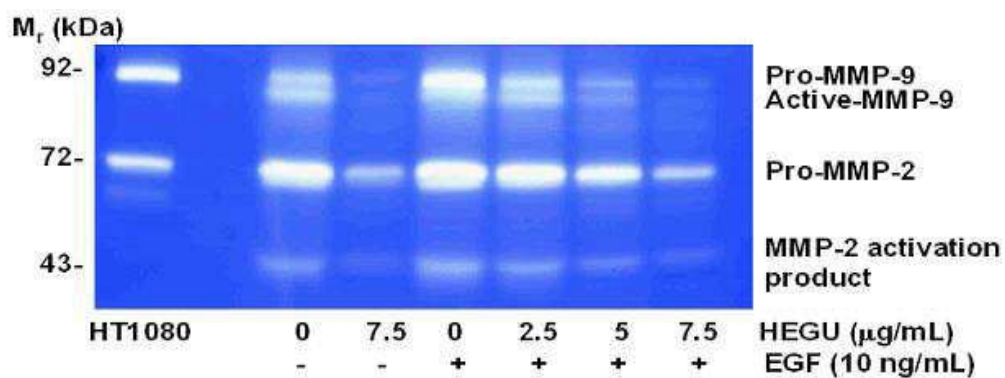
도면2a



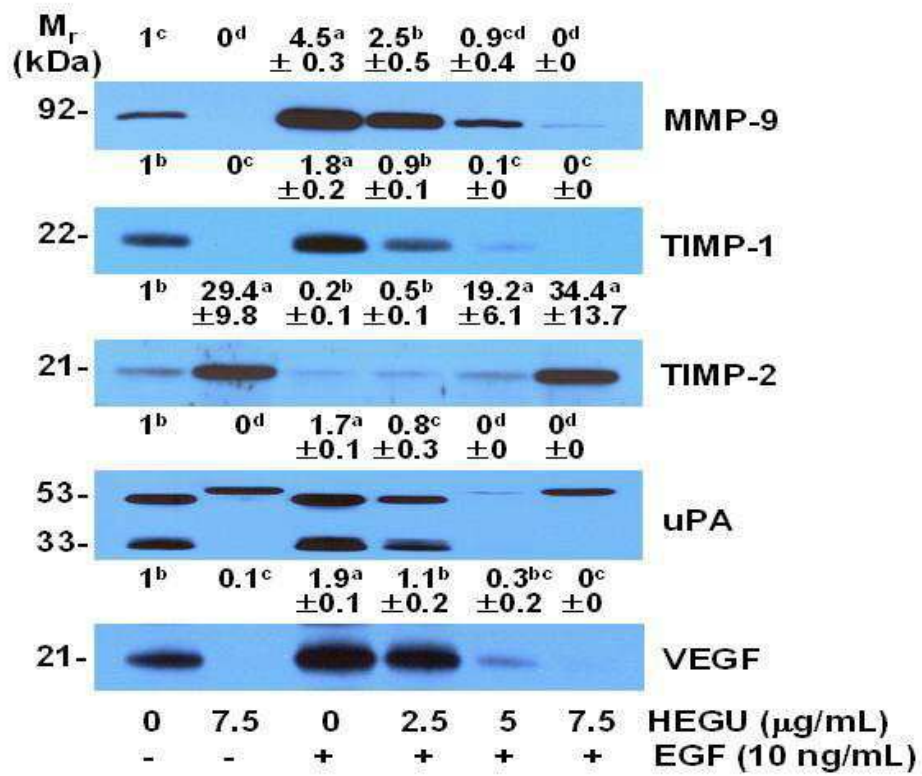
도면2b



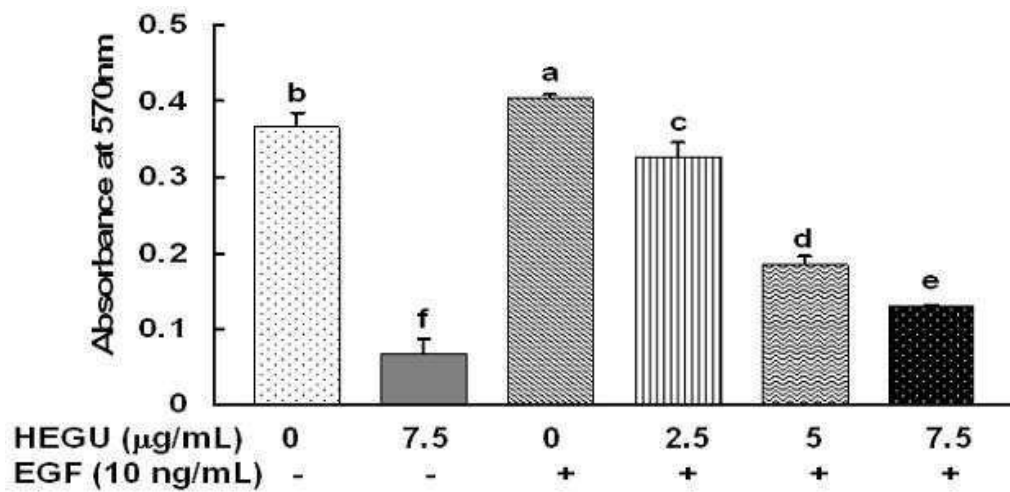
도면3a



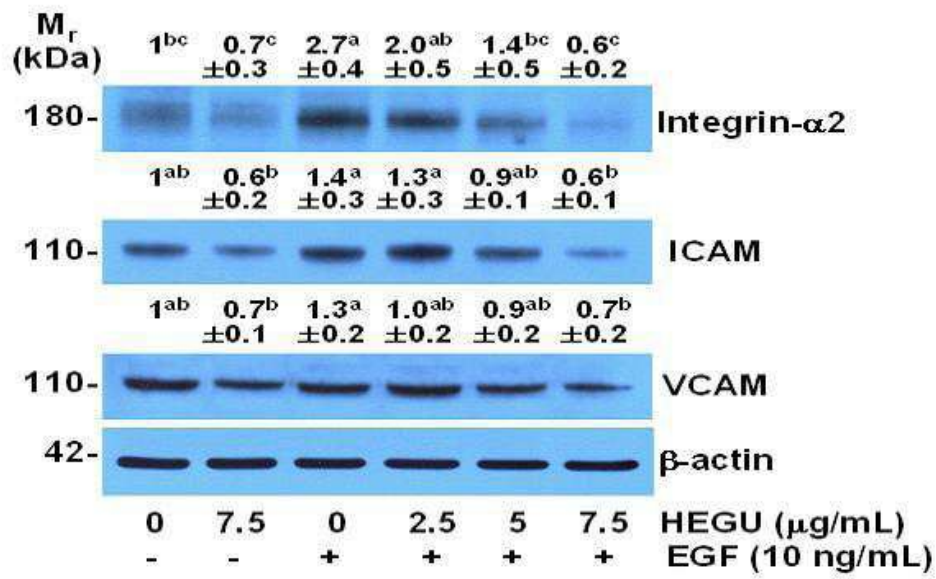
도면3b



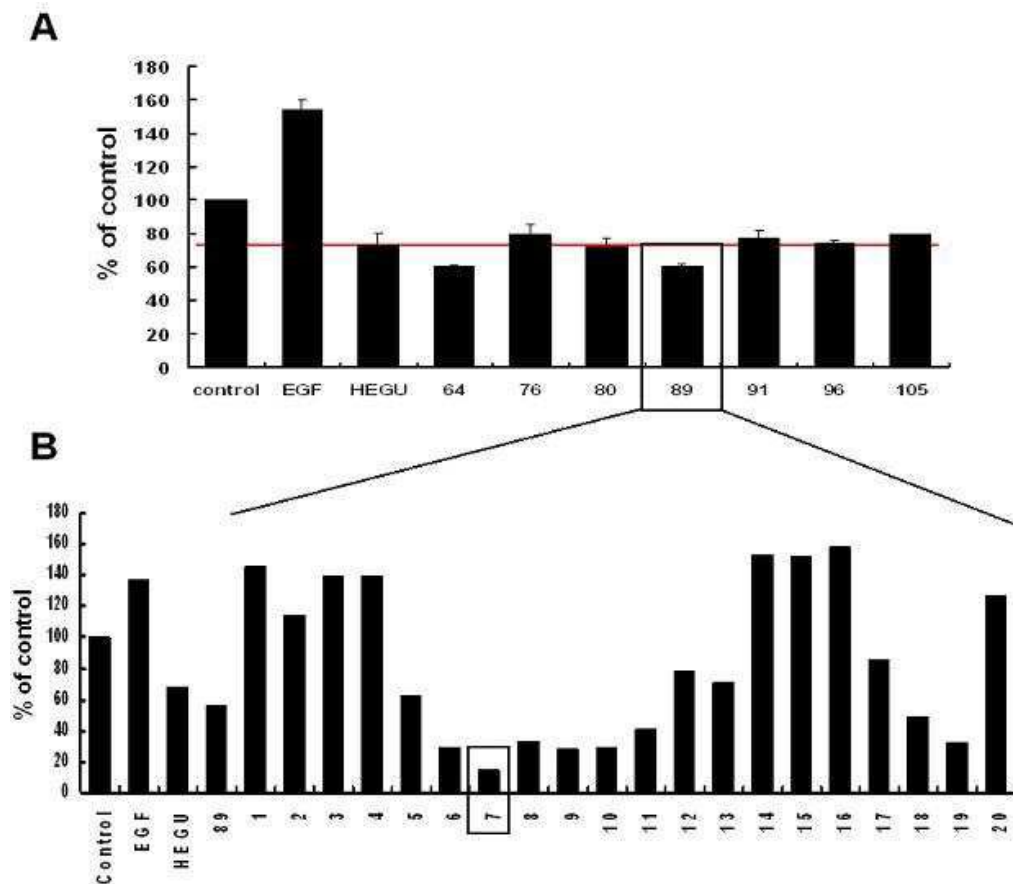
도면4a



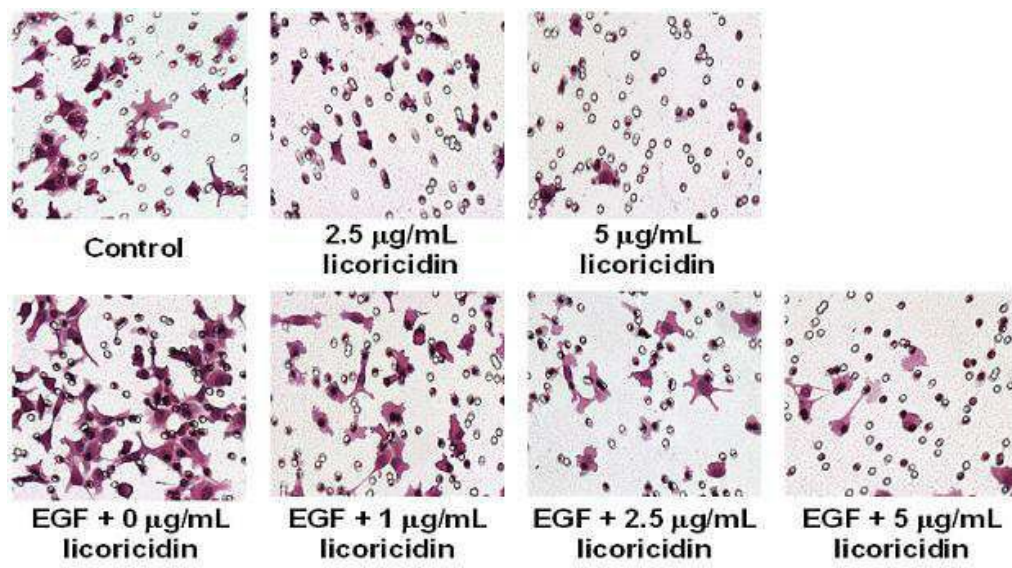
도면4b



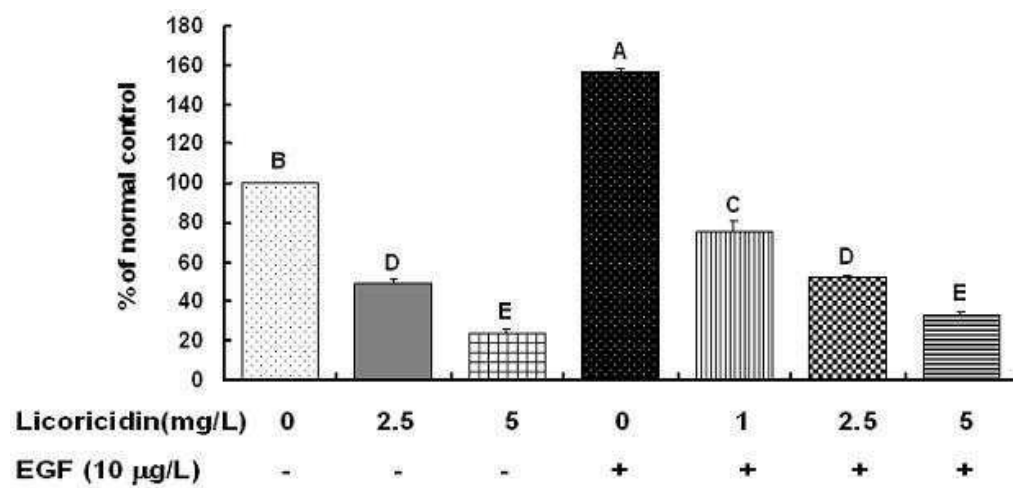
도면5



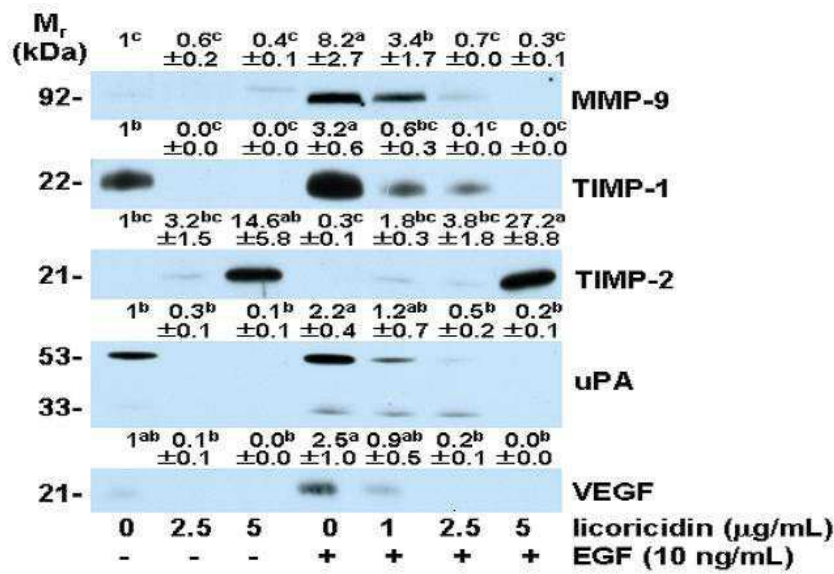
도면6a



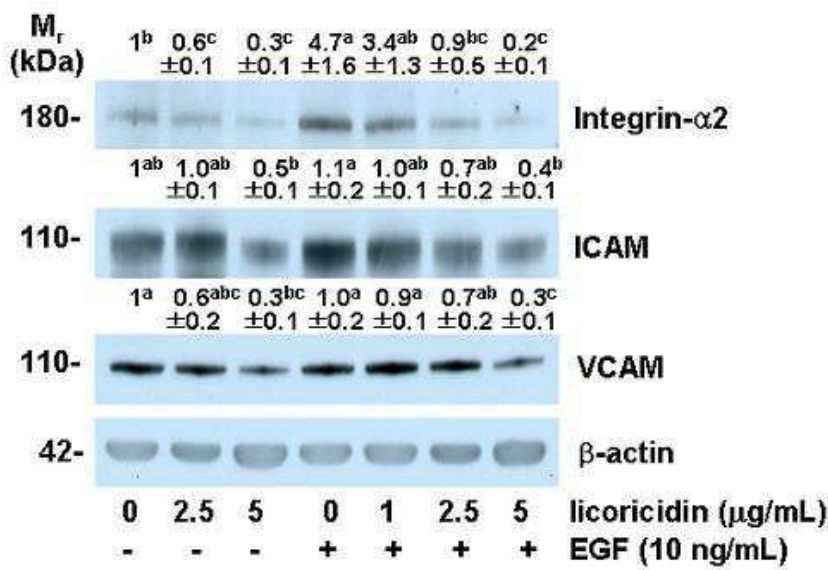
도면6b



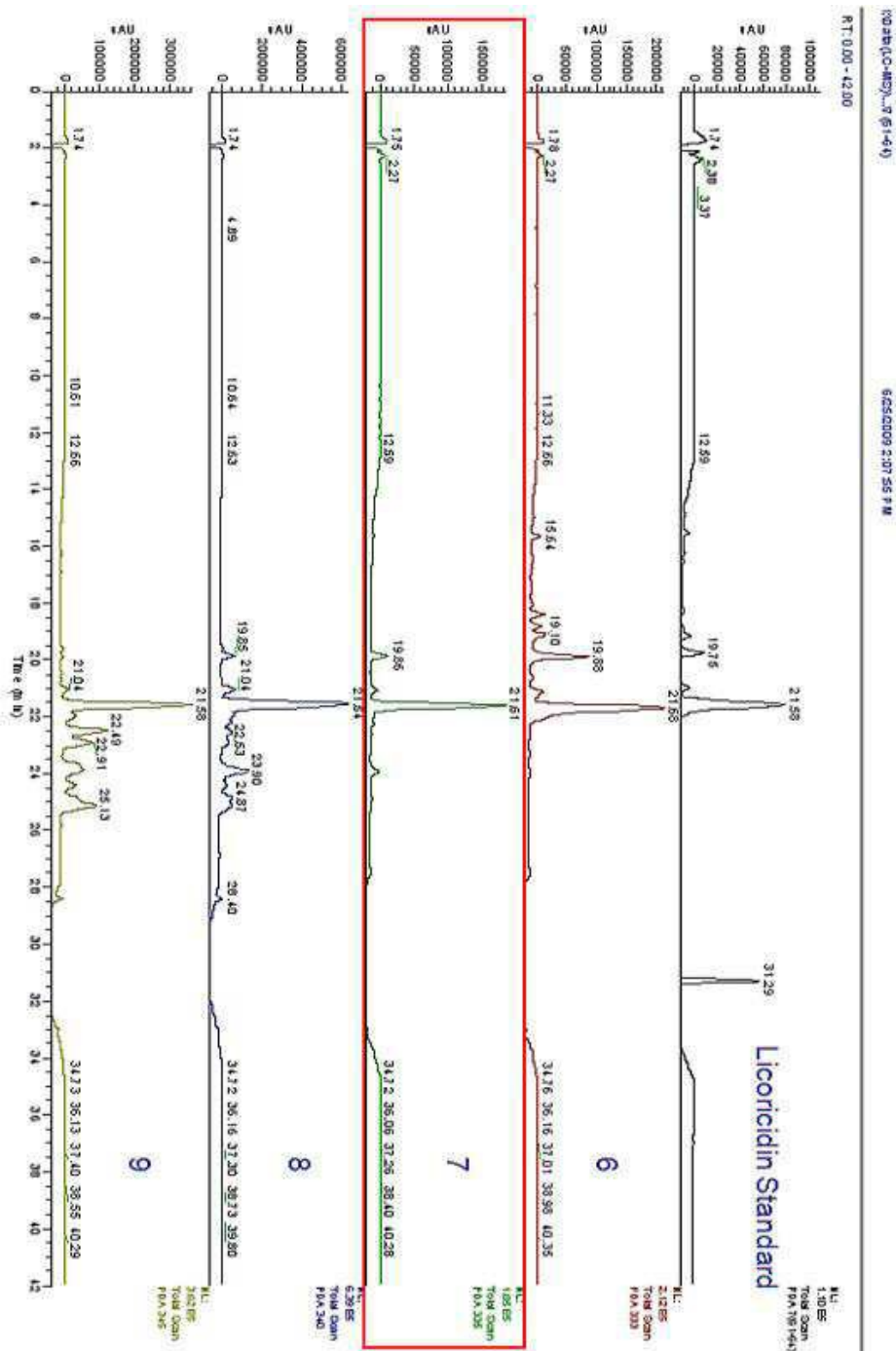
도면7a



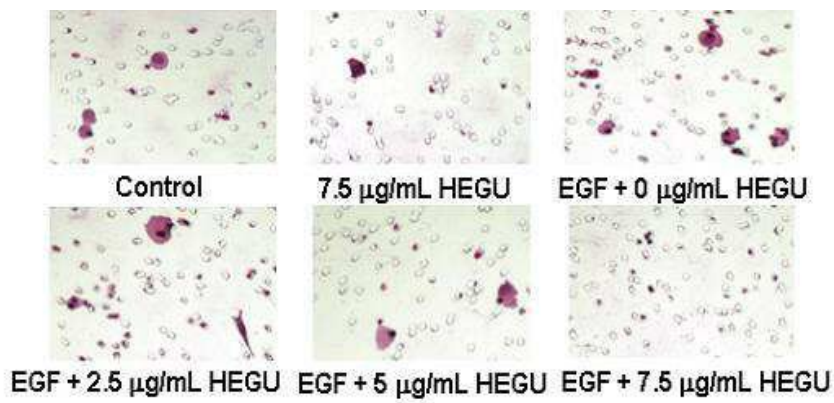
도면7b



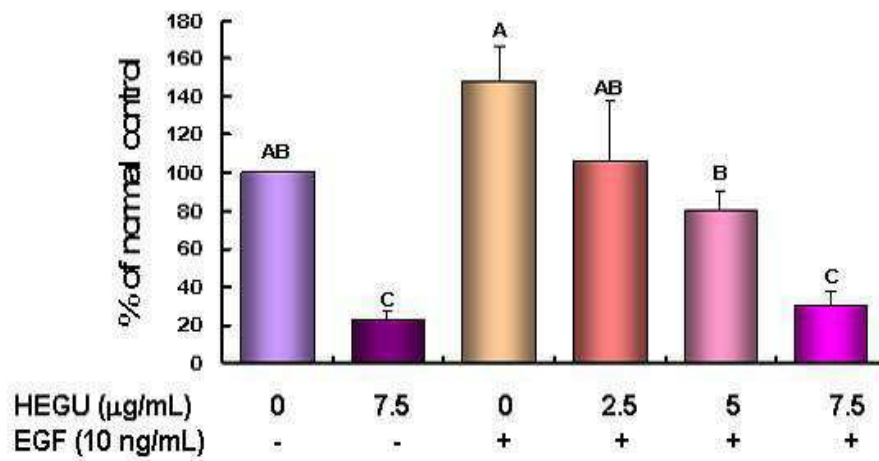
도면8



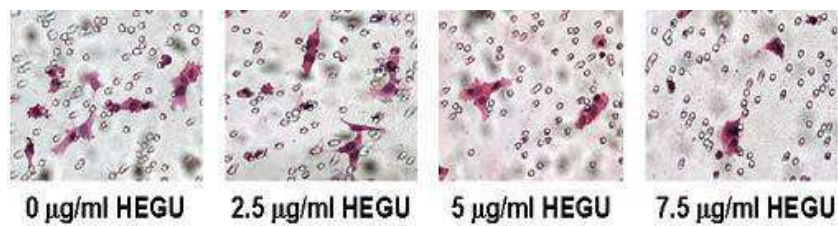
도면9a



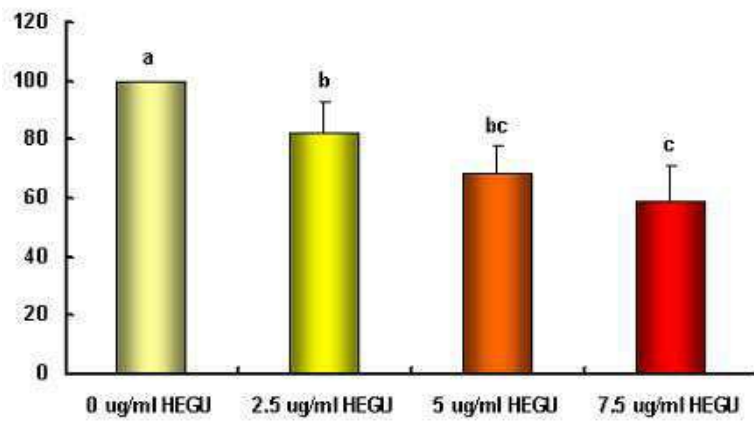
도면9b



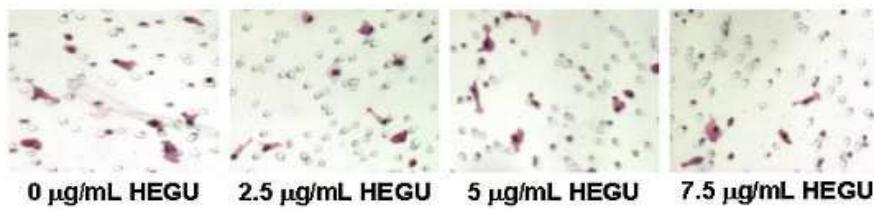
도면10a



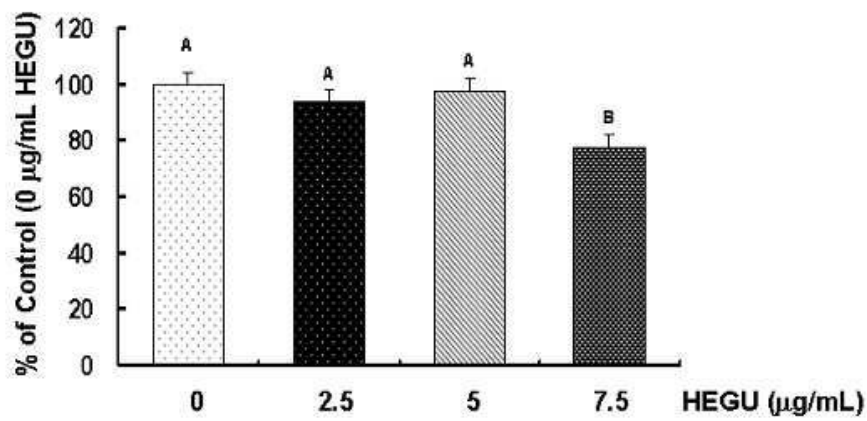
도면10b



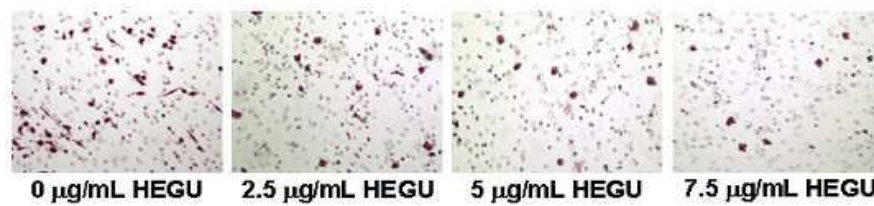
도면11a



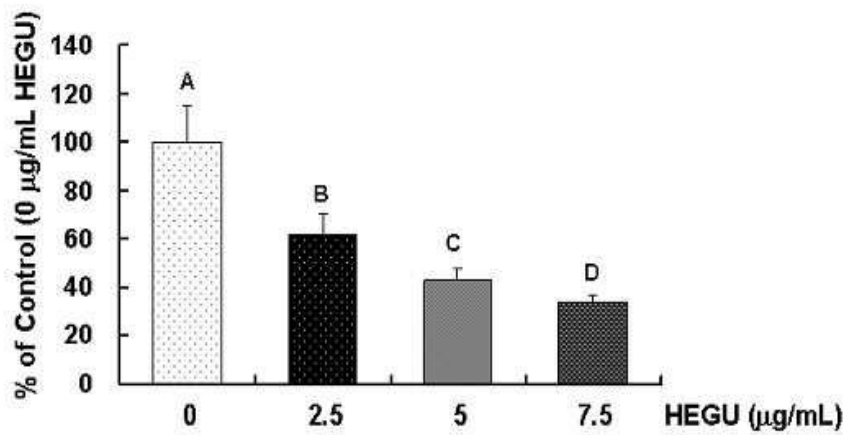
도면11b



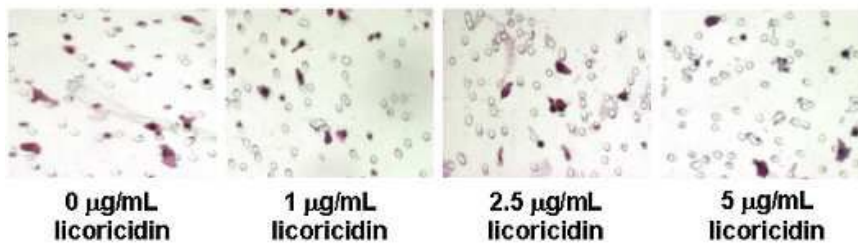
도면12a



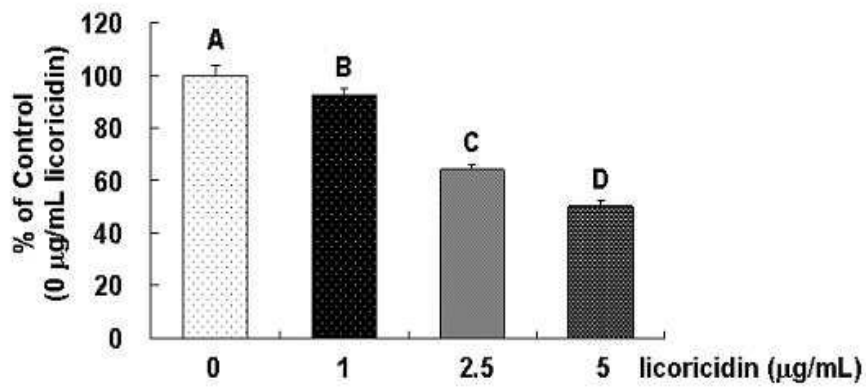
도면12b



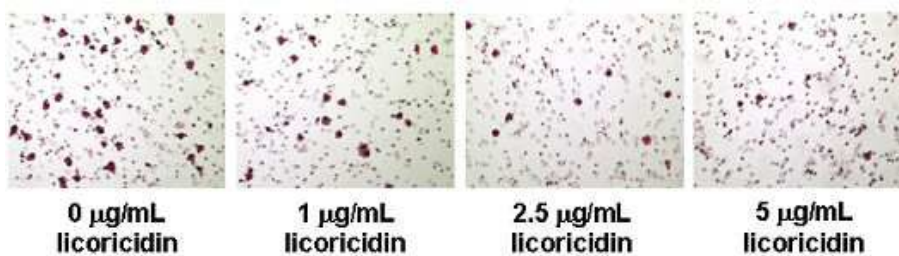
도면13a



도면13b



도면14a



도면14b

